



**Universidad de Sevilla Centro Andaluz de Biología Molecular y
Departamento de Medicina Regenerativa
Fisiología Médica y Biofísica**

**CAPACIDAD TRANSACTIVADORA
DEL GEN *pttg1*
Y SU IMPLICACIÓN EN
TUMORIGÉNESIS**

**TESIS DOCTORAL
ANA ROMERO FRANCO
SEVILLA, 2015**



**Universidad de Sevilla Centro Andaluz de Biología Molecular y
Departamento de Medicina Regenerativa
Fisiología Médica y Biofísica**

Capacidad transactivadora del gen *pttg1* y su implicación en tumorigénesis

Memoria presentada por la Licenciada D^a Ana Romero Franco para optar al grado de Doctora en Ciencias Biológicas por la Universidad de Sevilla

Director del trabajo de investigación:

Tutor:

Jaime Muñoz Franco

Antonio Castellano

Sevilla, Diciembre 2015

Esta tesis va dedicada a mi mayor tesoro, mi madre, porque todo lo que soy se lo debo a ella. A mi compañero de aventuras, Rafa y a mis tres soles, mis sobrinos Peter, Leo y Ava, que siempre me iluminan el alma.

ÍNDICE

ÍNDICE

Índice de contenidos

Abreviaturas

INTRODUCCIÓN

1. EL CÁNCER: Un Ecosistema enemigo	3
2. PTTG1 y cáncer	5
2.1 PTTG1 y cáncer de mama	5
3. El gen <i>hpttg1</i>/securina	6
3.1 Estructura del gen <i>pttg1</i>	7
3.2 Perfil de expresión en tejidos	7
3.3 Regulación de la expresión del gen	8
3.4 Regulación del ciclo celular y PTTG1	10
3.5 Estructura de la proteína	10
3.6 Localización Subcelular	12
3.7 Modificaciones transcripcionales	14
3.8 Miembros de la familia PTTG: Caracterización y perfiles de expresión	15
4. Funciones de PTTG1	15
4.1 Función securina/Replicación	15
4.2 Daño y Reparación de DNA	17
4.3 Elementos de unión a PTTG1	18
4.4 Actividad transactivadora	19
4.5 Proliferación celular	21
4.6 Transformación celular e inestabilidad cromosómica	22
4.7 Angiogénesis, metástasis y ETM	23
4.8 PTTG1 y Apoptosis	27
5. Microambiente del tumor	28
5.1 Células cancerígenas	28
5.2 Células endoteliales	29
5.3 Periocitos	29
5.4 Células inflamatorias del sistema inmune	30
5.5 Fibroblastos asociados al tumor	31
5.6 Componente no celular (ECM)	31
6. Citoquinas, factores de crecimiento y cáncer	32

6.1 Familia de las citoquinas	33
6.2 Citoquinas y microambiente del tumor	35
7. Migración celular y Adhesión focal	36
8. Muerte celular por pérdida de anclaje	39
8.1 Anoikis y apoptosis	39
8.2 Autofagia	41
8.3 Entosis	41
8.4 Necroptosis	42
9. Modelos animales para <i>pttg1</i>	44
 OBJETIVOS	 48
 MATERIALES Y MÉTODOS	
 MM.1 MATERIAL BIOLÓGICO	 52
1.1 Bacterias	
a) Cepas bacterianas utilizadas	52
b) Medios y condiciones de cultivo	
1.2 Cultivos Celulares	
1.2.1 Líneas celulares estables	52
1.2.2 Infección de líneas celulares	53
1.2.3 Cultivo de líneas celulares	54
1.2.4 Congelación y descongelación de células	54
1.3 Animales de experimentación	55
1.4 Otros reactivos	
a) Drogas	55
b) Antibióticos de selección	55
c) Anestésicos	56
 MM.2 MANIPULACIÓN DEL DNA	
2.1 Plásmidos	56
2.2 Cuantificación del DNA	58
2.3 Purificación de plásmidos desde bacterias	58
2.4 Digestión del DNA con enzimas de restricción	58
2.5 Electroforesis de DNA	59
2.6 Purificación de fragmentos de DNA de geles de agarosa	59

2.7 Transformación	59
2.8 Análisis de los transformantes	59
2.9 PCR semicuantitativa	60
2.10 PCR cuantitativa (PCR tiempo real)	60
2.10.1 Reactivos PCR tiempo real	
a) Sondas Taqman	61
b) Cebadores	62
c) SYBR y master mix Taqman	62
 MM.3 ANÁLISIS TRANSCRIPCIONAL	
3.1 Extracción de RNA total	63
3.2 Cuantificación de RNA	63
3.3 Tratamiento con DNAsa	63
3.4 Retrotranscripción	63
3.5 Arrays de expresión génica	64
3.6 Enriquecimiento de genes	65
3.7 Array de PCR en tiempo real	65
 MM.4 ANÁLISIS TRADUCCIONAL	
4.1 Extracción de proteínas	67
4.2 Cuantificación de proteínas por el método de Bradford	67
4.3 Electroforesis de proteínas en geles de SDS-poliacrilamida	67
4.4 Detección de proteínas con azul Comassie	68
4.5 Detección de proteínas con rojo Ponceau	69
4.6 Análisis de proteínas por <i>western blot</i>	69
a) Transferencia de proteínas a membrana de nitrocelulosa	69
a.1 Transferencia semiseca	69
a.2 Transferencia Húmeda	69
b) Inmunodetección de proteínas	70
4.7 Array de citoquinas	72
4.8 Inmunofluorescencia indirecta	73
 MM.5 MICROSCOPIA	
5.1 Microscopía de contraste de fase	74
5.2 Microscopía de fluorescencia	74
MM.6 ENSAYOS DE TRANSACTIVACIÓN	74

MM.7 MÉTODOS DE TRANSFECCIÓN

7.1 Transfección con sistemas lipídicos	75
7.2 Eugene 6	76
7.3 Fosfato cálcico	76
7.4 Electroporación	77
7.5 Obtención de líneas estables	77
7.6 Obtención de lentivirus	
7.6.1 Transfección de células A293T	78
7.6.2 Concentración de partículas virales	78
7.6.3 Titulación por citometría de flujo	79
7.6.4 Infección lentiviral	79

MM.8 CITOMETRÍA DE FLUJO

8.1 Ciclo celular	80
8.2 Muerte celular	80
8.3 Ensayo Anexina V	80

MM.9 VIABILIDAD CELULAR

9.1 Tinción con Sulforrodamina B	81
---	----

MM.10 ENSAYOS CELULARES *IN VIVO*

10.1 Migración celular: Ensayo de Herida	82
10.2 Análisis de migración: Ensayos de “Tracking”	82

MM.11 MODELOS ANIMALES

11.1 Xenotransplante ortotópico de mama	83
11.2 Técnicas de imagen <i>in vivo</i>	84
11.3 Medida del tumor	85
11.4 Análisis histológico	
11.4.1 Necropsia	85
11.4.2 Inclusión en parafina	85
11.4.3 Parafinado de muestras	86
11.4.4 Tallado del bloque	86
11.4.5 Corte con microtomo	86
11.4.6 Tinción Hematoxilina-eosina	87

RESULTADOS

Parte I: Estudiar la capacidad moduladora que ejerce el gen *pttg1* sobre la expresión de genes relacionados con el microambiente del tumor, en células inmortalizadas de ratón NIH3T3

1. Caracterización de los sistemas de sobreexpresión de PTTG1 en células de ratón	92
2. Cambios en el patrón de expresión génica producidos por la sobreexpresión de PTTG1	96
2.1 Array de RNA mensajero	96
2.2 Array de PCR en tiempo real	101
2.3 PCR en tiempo real	102
2.4 Análisis proteico de PTTG1	103
2.5 Array de proteínas citoquinas	105
2.6 Estudio de secuencias reguladoras del promotor del gen MCP1	106
3. Estudio de la capacidad migratoria e invasiva de células inmortalizadas que sobreexpresan PTTG1	107

Parte II: Determinar la capacidad transactivadora del gen *pttg1* en células humanas y estudio de su posible implicación biológica

1. Caracterización de los sistemas de sobreexpresión e interferencia en células humanas	110
2. Estudio de la capacidad transactivadora del gen <i>pttg1</i> en células humanas	113
3. Estudio del fenotipo que provoca la modulación del gen <i>pttg1</i> en la línea celular MCF7	114
4. Estudio de la expresión génica que produce la modulación del gen <i>pttg1</i> en la línea celular MCF7	121

Parte III: Estudio del modelo animal de xenotransplante en mama con la línea celular MCF7 en condiciones de sobreexpresión e interferencia de *pttg1*

1. Modelos animales: Xenotransplante en mama	124
---	------------

DISCUSIÓN

Parte I: Estudiar la capacidad moduladora que ejerce el gen *pttg1* sobre la expresión de genes relacionados con el microambiente del tumor, en células inmortalizadas de ratón NIH3T3 134

Parte II: Determinar la capacidad transactivadora del gen *pttg1* en células humanas y estudio de su posible implicación biológica 139

Parte III: Estudio del modelo animal de xenotransplante en mama con la línea celular MCF7 en condiciones de sobreexpresión e interferencia de *pttg1* 144

CONCLUSIONES 150

BIBLIOGRAFÍA 154

ABREVIATURAS

aa: Aminoácidos	FGF-2: Factor de crecimiento de fibroblastos
Ap^r: Ampicilina resistente	FBS: Suero fetal bovino
Kan^r: Kanamicina resistente	NCS: Suero de ternera recién nacida
Puro: Puromicina	EtBr: Bromuro de Etidio
DNA: ácido desoxirribonucleico	RT: temperature ambiente
cDNA: ADN complementario	H3: Histona-3
RNA: ácido ribonucleico	Kb: Kilobases
iRNA: RNA interferente	KDa: KiloDalton
mRNA: ARN mensajero	DO: densidad óptica
APC: Complejo promotor de anafase	Nt, N-terminal: Dominio amino terminal
DNA-PK: Protein quinasa dependiente de DNA	Ct, C-terminal: Dominio carboxilo terminal
CAT: cloranfenicol acetil transferasa	pb: pares de bases nitrogenadas
PTTG: gen transformante de tumores de pituitaria	PCR: reacción en cadena de la polimerasa
GAPDH: Gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa	PI: Yoduro de propidio
GFP: proteína verde fluorescente	U: unidades de enzima
wt: Silvestre (<i>wild type</i>)	UV: Ultravioleta
IPTG: Isopropil-b-D-tiogalactopiranosido	TU: <i>Transducing units</i>
PI3K: Fosfatidil inositol 3 quinasa	MOI: <i>Multiplicity of infection</i>
MAPK: Proteína quinasa activada por mitógenos	dATP: <i>Deoxyadenosine triphosphate</i>
STAT3: transductor de señal y activador de la transcripción 3	dCTP: <i>Deoxycytidine triphosphate</i>
MCP-1 (CCL2): Proteína quimioatrayente de monocitos	dGTP: <i>Deoxyguanosine triphosphate</i>
SDF1α (CXCL12): factor derivado de células del estroma 1	dNTP: <i>Deoxyribonucleotide triphosphate</i>
TGFβ: Factor de crecimiento transformante β	dTTP: <i>Deoxythymidine triphosphate</i>
VEGF: factor de crecimiento del endotelio vascular	
IGF-1: Factor de crecimiento insulínico tipo1	

INTRODUCCIÓN

1. El cáncer: Un ecosistema enemigo

El cáncer es más que una enfermedad considerada de la edad, generalmente ocurre después de una vida de acumular daños en la integridad de nuestro DNA, que finalmente superan los mecanismos de control y reparación de nuestro cuerpo. Más de un tercio de los casos de cáncer se producen en personas mayores de 75 años, mientras que menos del 1% ocurre en niños y adolescentes (Westhoff et al., 2014). Es por ello que muchas de las terapias habían sido desarrolladas y optimizadas para personas de avanzada edad con unas particularidades diferentes. Este cambio de mentalidad lleva a la necesidad de nuevas terapias que otorguen calidad de vida a pacientes mucho más jóvenes y nos plantea una pregunta que puede parecer trivial, pero que durante la última década se ha demostrado que está lejos de tener respuesta: ¿Qué engloba el cáncer?

La visión moderna de qué constituye el cáncer, ha evolucionado a lo largo de los últimos 60 años, a partir de 1953 con la hipótesis de múltiples etapas; que condujo a la creciente identificación de genes y oncogenes en la década de los 70 (Westhoff et al., 2014). Una célula individual o una pequeña población de células, acumula una creciente cantidad de mutaciones a lo largo del tiempo, que la guía hacia un crecimiento incontrolado y una independencia cada vez mayor de su entorno, permitiéndole evitar las señales de muerte y metastatizar, esto es conocido como las señas de identidad ("*hallmarks*") del cáncer (Hanahan D. et al, 2011; Kaessmann H. et al., 2010). Esta teoría sugiere que el cáncer es consecuencia de a una combinación de mutaciones esenciales ("*driver*"), que hacen posible la progresión del tumor y una serie de mutaciones azarosas, que guían a una expansión clonal de esta subpoblación (Westhoff MA, et al., 2014). El modelo de células madre del cáncer ("*cancer stem cell*") tuvo su auge en los años 90, aportando complejidad al sistema, cuya hipótesis postulaba la existencia de un nicho de células madre en el tumor, donde residían células con capacidad de autorenovación y diferenciación. Estas células eran sólo una fracción del tumor, pero debido a su alta plasticidad fenotípica y su capacidad de quedar quiescentes se consideraban responsables de las recaídas tras la terapia.

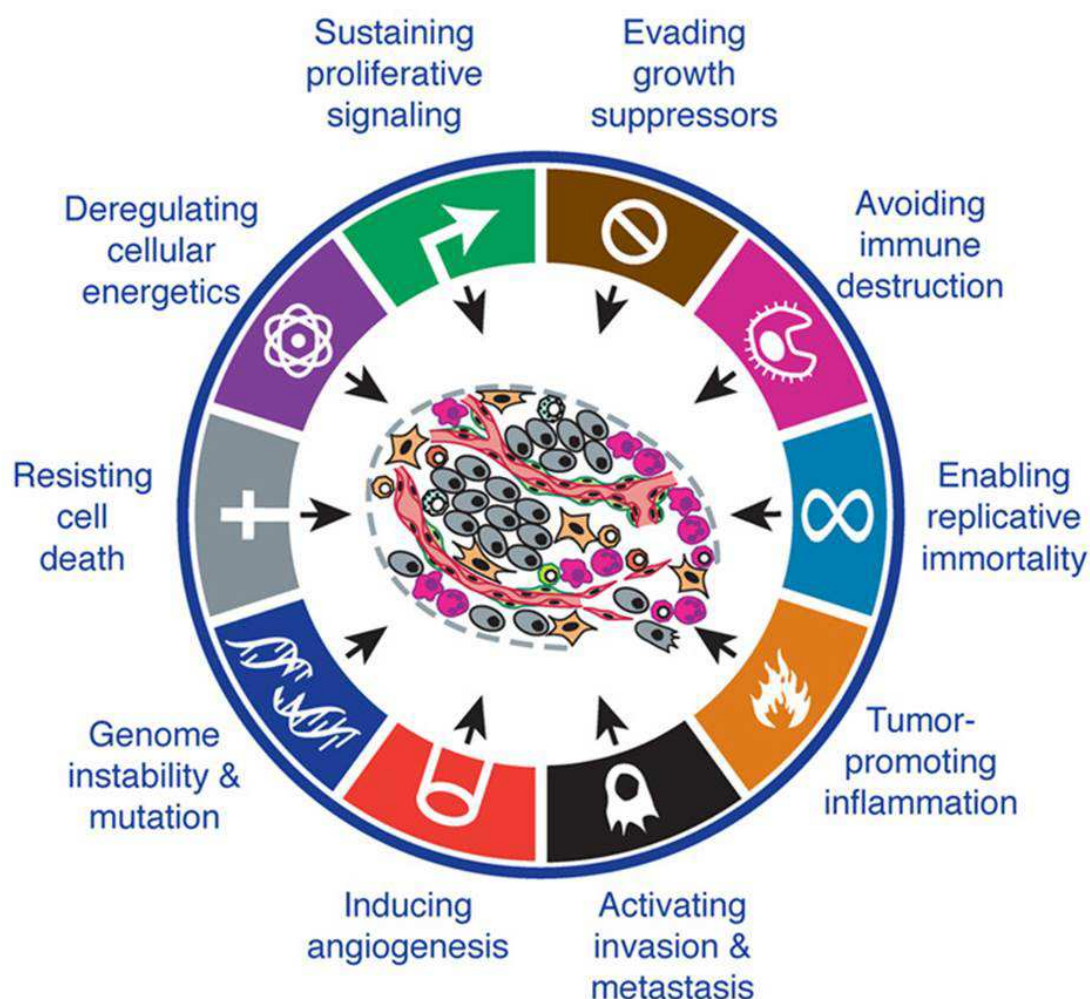


Figura 1. Principales características del cáncer, que están siendo dianas terapéuticas (Adaptada de Hanahan D. and Weinberg R.A., Cell, 2011).

Durante esta década se ha consolidado y extendido la apreciación de que los tumores son más que una masa de células que proliferan, asemejándose más bien a tejidos complejos compuestos por múltiples tipos celulares que interaccionan unas con otras, revelando que la biología de los tumores ya no puede entenderse simplemente enumerando rasgos de la célula cancerosa, sino que debe abarcar desde el microambiente del tumor hasta la tumorigénesis (Hanahan D, Weinberg RA, 2011), considerando el cáncer no como un conjunto de células mutadas sino como un complejo ecosistema.

2. PTTG1 y cáncer.

El gen transformante de pituitaria (PTTG1) es un oncogén identificado en los últimos 20 años, que se encuentra sobreexpresado en un amplio rango de tejidos cancerosos, incluidos carcinomas escamosos esofageal y oral, adenomas de pituitarias, cáncer de ovario, cáncer de tiroides, hepatocarcinomas, cáncer de mama, cánceres hematopoyéticos y gliomas. La alta expresión de PTTG1 correlaciona con mal pronóstico clínico, probablemente porque su sobreexpresión puede guiar a mantener la inducción de mitógenos como c-Myc y FGF2, inhibición de supresores tumorales y rutas pro-apoptóticas (Cho-Rock J. et al., 2006) o reducir la sensibilidad de drogas anti-neoplásicas. El proceso de transformación maligna en líneas celulares promueve la expresión de genes mitógenos, apoptóticos y angiogénicos. En estudios realizados en 1999, la inyección subcutánea de NIH3T3 sobreexpresando PTTG1, en ratones nude timectomizados, resultó en el desarrollo de tumores en tres semanas (McCabe et al., 1999). Durante la última década, la participación del gen *pttg1* en el desarrollo de ciertos tumores se ha demostrado en numerosos trabajos de investigación; sin embargo, su mecanismo de acción a través del cual participa en el desarrollo de esta enfermedad, sigue planteando mucha controversia

2.1 PTTG1 y cáncer de mama

La expresión de PTTG1 en cáncer de mama ha sido documentada en varias ocasiones (Saez et al. 1999, Solbach et al. 2004, Ogbagabriel et al. 2005). Lo et al. desarrollaron una hipótesis que indica que los genes asociados con el checkpoint mitótico podrían estar relacionados con el cáncer de mama, investigando los polimorfismo de un único nucleótido (SNPs) en diversos genes, entre ellos PTTG1 (Lo et al. 2007). Sus resultados indicaron que SNPs en PTTG1 está asociado con la elevada incidencia de cáncer de mama en mujeres, sugiriendo que la pérdida de la integridad de los cromosomas y aneuploidía puede influir en la tumorigénesis, aunque a través de mecanismos aún desconocidos (Lo et al. 2007).

La detección de PTTG1 en mujeres taiwanesas correlaciona con el tamaño del tumor, grado histológico y presencia de metástasis en nódulos linfáticos (Chen et al. 2006). La expresión de PTTG1 es máxima en carcinoma ductal invasivo, carcinoma de mama metastático y cultivos celulares de carcinoma de mama. Además los niveles de RNAm de Pttg1 también correlacionan con invasión y metástasis en este tipo de tumores (Ogbagabriel et al. 2005; Solbach et al. 2004, Chen et al. 2006), pero el mecanismo de actuación aún no ha sido descrito.

En la línea celular de cáncer de mama MCF7, los niveles de RNAm y de proteína de PTTG1 son estimulados por insulina e IGF-I de manera dependiente de tiempo y de dosis (Thompson & Kakar 2005). La ruta de las PI3K está implicada en esta inducción a través de la insulina y de IGF-I, debido a que el empleo de inhibidores de PI3K elimina completamente esta inducción, sin embargo, inhibidores de la ruta de las MAPK solo la reducen parcialmente. Así, la cascada de las PI3K parece ser la ruta dominante por la cual insulina e IGF-1 ejercen su efecto induciendo PTTG1 en células de cáncer de mama (Thompson & Kakar 2005; Hansen RK. Et al., 2000).

3. El gen *hpttg1*/securina

El gen transformante de tumores de pituitaria (*pttg1*) es un oncogén específico de tumores de hipófisis, que fue aislado hace más de una década en células tumorales de pituitaria de rata GH4 y por ello se le otorgó dicho nombre. Su homología estructural inclinó la identificación de la proteína PTTG1 como una securina de vertebrados, con función crítica en la separación de las cromátidas hermanas durante la mitosis (Zou H. et al. 2004). Los miembros de la familia PTTG, incluyen PTTG1, PTTG2 y PTTG3. Crecientes datos disponibles confirman la sobreexpresión de PTTG1 en numerosos tipos de tumores, tanto endocrinos (pituitaria, tiroides, mama, ovario y uterino) como no endocrinos (sistema nervioso, pulmonar y gastrointestinal) y se ha correlacionado en gran medida sus altos niveles de expresión con la invasividad del tumor y metástasis (Ramaswamy S. et al. 2003). Sus funciones mejor descritas se centran en la replicación celular (Zou H. et al. 2004), reparación del daño a DNA (Romero F. et al. 2001), desarrollo de órganos y

metabolismo (Wang Z. et al. 2001), además de estudios que apuntan hacia su participación en la regulación proteína-proteína, actividad transactivadora y regulación paracrina y autocrina.

3.1 Estructura del gen *pttg1*

Pttg1 fue aislado de la línea celular GH4 de pituitaria de rata por Differential display, obteniendo un mRNA específico que se expresaba diferencialmente. Usando este fragmento de PCR como sonda en una librería de cDNA de pituitaria de rata, se pudo clonar y caracterizar el clon de cDNA completo de *pttg1* en esta especie (nº acceso GenBank: U73030). El gen *pttg1* de rata está compuesto por cinco exones y cuatro intrones, y el sitio de comienzo de la transcripción fue mapeado en un residuo de timidina 44pb aguas arriba del codón de iniciación ATG (Pei L. 1998; Lee IA. Et al., 1987).

Usando cDNA de *pttg1* de rata como sonda en un screening, se caracterizó su homólogo humano en una librería de cDNA de hígado fetal, mostrando una tasa de homología del 85% respecto a la región codificante de rata (Zhang X et al. 1999). Fueron varios grupos los que caracterizaron al mismo tiempo y de modo independiente el gen *pttg1h* localizado en el cromosoma 5, en la posición 5q33 o 5q35.1, con un tamaño de unas 10 Kb y aunque al principio se pensó que estaba compuesto por cinco exones y cuatro intrones (Kakar, 1999; Prezant et al., 1999; Zhang et al., 1999b), se ha demostrado la existencia de un exón adicional en la región 5' no codificante (Clem et al., 2003).

Mediante el uso de parejas de oligos degenerados, diseñados a partir de la secuencia de cDNA de *pttg1* de rata, se consiguió clonar y secuenciar el gen *pttg1* de ratón, que mostró una homología del 88% y del 78% con el cDNA de *pttg1* de rata y de humano respectivamente (Vlotides G. et al., 2007).

3.2 Perfil de expresión en tejidos

Estudios iniciales, establecieron que PTTG1 se encontraba predominantemente en testículo, presentando una baja o ausente expresión en otros tejidos (Pei & Melmed 1997, Pei 1998). En tejido humano, se detectaron altos niveles de RNAm de Pttg1 en hígado fetal, en tejido adulto de timo y

testículo, con débil expresión en colon, intestino, cerebro, placenta y páncreas (Pei & Melmed 1997, Pei 1998). Sin embargo se observaron altos niveles de RNAm de Pttg1 en una amplia variedad de líneas celulares de tumores malignos, tales como líneas de leucemia (HL-60, K-562 o MOLT-4), adenocarcinoma de cérvix (HeLa), carcinoma colorectal (SW480), carcinoma de pulmón (A549), melanoma (G361) y gliomas (Zhang *et al.* 1999; Filipella M. *et al.*, 2006; Genkai N., 2006).

3.3 Regulación de la expresión del gen

Los estrógenos son un importante regulador de la expresión de RNAm de Pttg1 de pituitaria. Esta regulación por estrógenos puede ser específica del tipo celular, afectando por ejemplo a células de pituitaria pero no a células de glioma.

También se ha demostrado que en la línea celular MCF7 y en astrocitos malignos, insulina e IGF-1 (factor de crecimiento tipo insulina) activan la transcripción de RNAm de Pttg1 a través de las rutas de señalización PI3K y MAPK (Chamaon *et al.* 2005, Thompson & Kakar 2005). Aunque aún no se conoce con certeza si esta inducción ocurre como un efecto directo, debido al tratamiento con el agente, o bien como un efecto secundario consecuencia de la estimulación de la proliferación celular y con ello toda la maquinaria del ciclo celular (Heaney AP. *et al.*, 2001; 2002).

Además otros factores están involucrados en la regulación de la expresión de PTTG1, tales como: Ca²⁺, hidrocortisona, ciclosporina A o factor de crecimiento de hepatocitos (Stoika & Melmed 2002).

Estudios muy recientes, han proporcionado evidencias de que PTTG actúa como diana del gen STAT3 en cáncer de colon. De este modo, STAT3 induce la expresión de PTTG y promueve la transformación y motilidad. Estos datos proporcionan evidencias de mecanismos regulatorios responsables de la abundancia de PTTG en tumores (Cuiqi Zhou *et al.*, 2014). Los últimos datos obtenidos en 2015, indican que FoxM1 activa también la transcripción de PTTG1 a través de la unión a su promotor, de manera que la sobreexpresión de FoxM1 desregularía a PTTG1 en células de cáncer colorectal (Yun Zheng *et al.*, 2015).

Factor de crecimiento/hormona	Células	Efecto en expresión de PTTG1
Estrógeno	Adenoma de pituitaria	+
bFGF	Adenoma de pituitaria	+
PARP γ , agonistas	Adenoma de pituitaria	-
EGF/TGF α	Astrocitoma	+
HGF	Astrocitoma	+
Insulina, IGF-1	Astrocitoma, MCF-7	+
Ca ²⁺ vía CaR	H-500 células tumorales de Leyding	+

+, regulación positiva. -, regulación negativa.
bFGF, factor básico de crecimiento de fibroblastos; CaR, receptor nivel Calcio; EGF, factor de crecimiento epidérmico; HGF, factor de crecimiento de hepatocitos; IGF-1, factor de crecimiento como insulina-1; PARP- γ , receptor γ de la actividad proliferadora del peroxisoma; PTTG, gen transformante de tumores de pituitaria; TGF, factor de crecimiento transformante.

Tabla 1. Regulación de la expresión de PTTG1 por varios factores de crecimiento y hormonas. (Adaptado de Tfelt-Hansen et al. 2006).

3.4 Regulación del ciclo celular y PTTG1

PTTG1 juega un papel muy importante en la mitosis, ya que actúa como una proteína securina inhibiendo la separación prematura de las cromátidas hermanas. Las cohesinas unen a las cromátidas hermanas durante metafase y son degradadas por la separasa para permitir la separación de estas en anafase. PTTG1 bloquea la separación de las cromátidas hermanas durante metafase uniéndose a separasa y evitando que estas degraden a las cohesinas. El hecho de que los ratones knockout para securina sean viables, indica que existe un mecanismo redundante para controlar este proceso, aunque su ausencia esté asociada a la presencia de aneuploidias. La máxima expresión de la proteína PTTG1 se alcanza en la fase S-G₂ y esta se degrada al final de metafase por el complejo promotor de anafase (Huang X. et al., 2005).

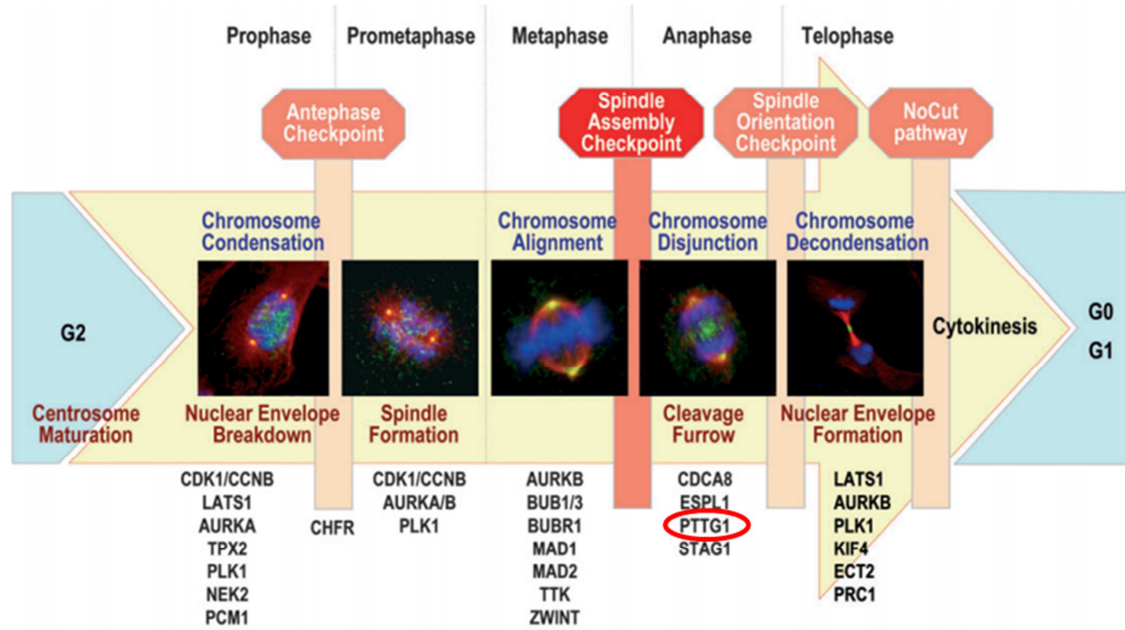


Figura 2. Visión celular y molecular de la mitosis. La figura representa células NIH3T3 en diferentes estados durante la mitosis. (Pérez de Castro *et al.* 2007).

3.5 Estructura de la proteína

La proteína PTTG1 de rata, ratón y humano posee un tamaño aproximado de 21-22kD, aunque en gel de SDS-PAGE, PTTG1 de roedores migra alrededor de 25kD y la de humanos entre 28-30kD, sugiriendo la

existencia de modificaciones posttraduccionales (Dominguez et al., 1998; Yu and Melmed, 2001).

La estructura de la proteína PTTG1 de mamíferos, está formada fundamentalmente, por un dominio regulador en su región N-terminal y un dominio funcional en su región C-terminal.

PTTG1 humano es extremadamente hidrofílica y posee una región N-terminal rica en aminoácidos básicos. En su región C-terminal, posee 2 motivos ricos en prolina que dan lugar al dominio de interacción SH-3, que permite a PTTG1 interaccionar con proteínas que presentan este dominio. Diversos estudios han demostrado la importancia de la región SH-3BD en el desarrollo de las funciones de PTTG1, incluyendo su capacidad transformadora, su efecto proliferativo, su actividad transactivadora, la inducción de la expresión del simportador sodio-yodo y la inducción de la secreción de hormona en células de pituitaria (Pei 1998, 2000; Heaney et al., 2001; Wang et al., 2001; Sáez et al., 2002; Boelaert et al., 2007). Además en la región C-terminal, se han identificado un dominio de unión a DNA y un dominio de transactivación.

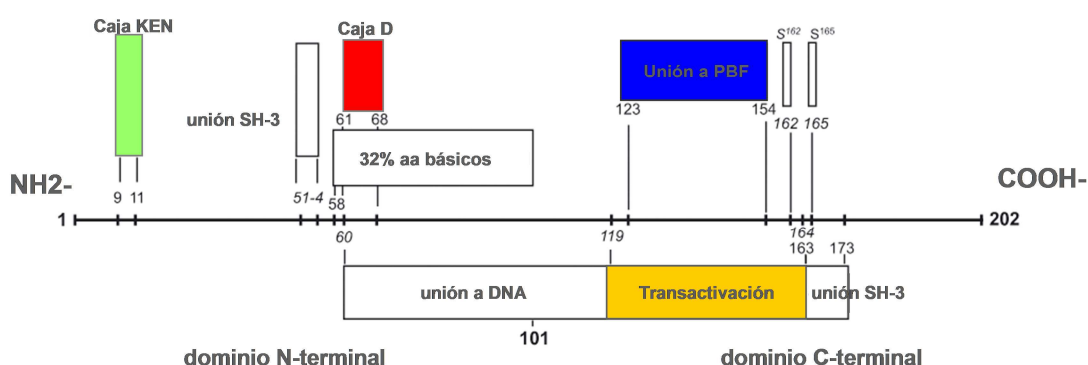


Figura 3. Ilustración esquemática de la proteína PTTG1 de mamíferos, que comprende principalmente una región reguladora en el dominio N-terminal y una región funcional en el dominio C-terminal. (Adaptado de Vlotides et al. 2007).

La región N terminal contiene las cajas de destrucción D y KEN, conservadas en PTTG1 humano, de rata y ratón, reconocidas por el sistema APC/C y por tanto involucradas en la degradación de la proteína (Zur and Brandeis, 2001). Además posee un motivo de degradación por el sistema SCF^{β-TrCP} (Limón-Mortes et al., 2008).

3.6 Localización subcelular

PTTG1h localiza en citoplasma y en núcleo, aunque la proporción de la localización nuclear versus citoplásmica puede variar en función de los sistemas celulares y tipos de tumores examinados (Chien and Pei, 2000; Dominguez et al., 1998; Sáez et al., 1999; Stratford et al., 2005; Yu et al., 2000b; Zhang et al., 1999a). Se conoce que PTTG1 nuclear actúa como securina, inhibiendo la separación prematura de las cromátidas hermanas, y como activador transcripcional, sin embargo, el papel de PTTG1 en el citoplasma aún no está totalmente definido (Zhang et al., 1999; Zhou et al., 2005; Tfelt-Hansen et al., 2006; Moreno-Mateos et al., 2011). La translocación de PTTG1 del citoplasma al núcleo puede estar facilitada por el factor de unión a PTTG1 (PBF), que contiene una señal de localización nuclear, o bien por otro mecanismo que envuelve la ruta de las MAPK. La expresión de la forma constitutivamente activa de MAPKK (MEK1) facilita la translocación de PTTG1 al núcleo a través de su fosforilación en células Cos-7 (Pei, 2000).

Estudios realizados en nuestro laboratorio mostraron la diferente localización de PTTG1 según la fase del ciclo celular. En fase G1 se localiza en la cara *cis* del aparato de Golgi y en núcleo. En fase S y G2 se localiza en el citosol y núcleo; y en mitosis se observa por toda la célula (Moreno-Mateos et al., 2011). La localización de PTTG1 en Golgi y centrosoma, así como su interacción con proteínas del centro organizador de microtúbulos (MTOC), sugiere que tiene un papel en la polarización celular y migración (Moreno-Mateos et al., 2011).

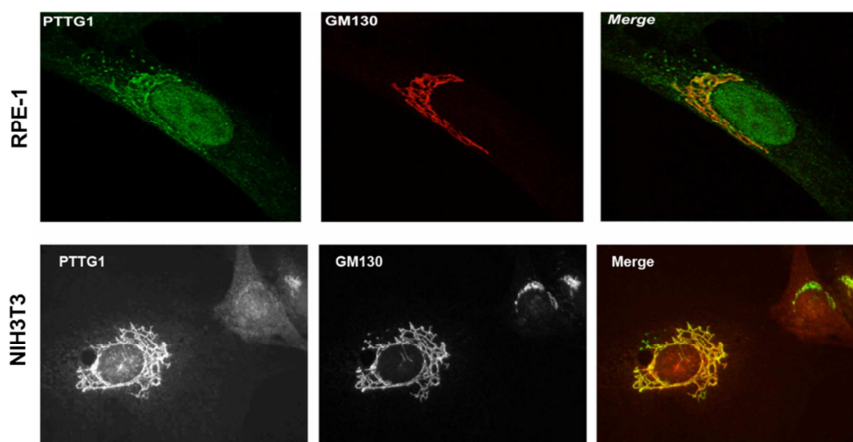


Figura 4. PTTG1 está presente en citoplasma, núcleo y asociada al aparato de Golgi en células RPE-1 y NIH3T3 (Adaptado Moreno-Mateos et al., 2011).

Estudio	Tejido	Citoplásmico	Nuclear
A. Localización de PTTG predominantemente citoplásmica			
<i>Minematsu et al. (2006)</i>	Adenomas de pituitaria	+++	+
<i>Boelaert et al. (2003 a,b)</i>	Cerebro fetal	+	-
	Cerebro adulto	+++	-
<i>Boelaert et al. (2003 b)</i>	Adenomas de pituitaria	+++	-
<i>Saez et al. (1999)</i>	Adenomas de pituitaria	+++	+
B. Localización de PTTG predominantemente nuclear			
<i>Filippella et al. (2006)</i>	Adenomas de pituitaria	-	+++
<i>Genkai et al. (2006)</i>	Gliomas	-	+++
<i>Uccella et al. (2005)</i>	Adenomas de pituitaria	+	+++
<i>Saez et al. (1999)</i>	Adenocarcinoma de mama	++	+++
	Adenocarcinoma de pulmón	++	+++
<i>Saez et al. (2002)</i>	Linfoma de Hodgkin's	-	++
C. Localización de PTTG variable citoplásmica y nuclear			
<i>Wierinckx et al. (2007)</i>	Tumores de pituitaria PRL***	Variable***	Variable***
<i>Winnepenninckx et al. (2006)</i>	Melanomas	Variable*	Variable*

+++ , expresión predominante; ++, expresión considerable; +, expresión baja; -, no expresión; variable*, patrón de expresión nuclear y citoplásmico variable; **, células Reed-Sternberg; variable***, solo citoplásmico en tumores invasivos y no invasivos, pero citoplásmico y nuclear en invasivos agresivos.

Tabla 2. Localización de PTTG en tejido normal o neoplásico (Adaptado de Salehi *et al.* 2008).

Estudio	Línea celular	Citoplásmica	Nuclear
A. Localización de PTTG predominantemente citoplásmica			
<i>Kim et al. (2007 c)</i>	HCT116	+++	+
<i>Akino et al. (2005)</i>	Hepatocitos	+++	-
<i>Mu et al. (2003)</i>	Hela	+++	+
	Cos-7	+++	+
	DU145	+++	+
<i>Yu et al. (2000b)</i>	JEG-3	+++	++
	3T3	+++	++
	GH3	+++	++
	AtT20	+++	++
	SKOV3	+++	++
	MCF-7	+++	++
	COS-7	+++	++
B. Localización de PTTG predominantemente nuclear			
<i>Dominguez et al. (1998)</i>	Células Jukrat	+	+++
C. Localización de PTTG variable citoplásmica y nuclear			
<i>Chamaon et al. (2005)</i>	U87MG	Variable	Variable
	U138MG	Variable	Variable
	LN405	Variable	Variable
<i>Mu et al. (2003)</i>	A459	Difuso	Difuso
	DLD-1	Difuso	Difuso
	NIH3T3	Difuso	Difuso

+++ , expresión predominante; ++, expresión considerable; +, baja expresión; -, no expresión; variable, patrón variable de Expresión nuclear y citoplásmica.

Tabla 3. Localización citoplásmica y nuclear de PTTG en líneas celulares. (Adaptado de Salehi *et al.* 2008).

3.7 Modificaciones posttranscripcionales

Fosforilación

Se ha observado que la fosforilación de PTTG1 ocurre de forma dependiente del ciclo celular (Ramos Morales et al., 2000; Romero et al., 2001) a través de las rutas MAPK y PI3K (Wang & Melmed 2000^a; Chamaon et al., 2005). La fosforilación de PTTG1 a través de la vía de las MAPK, se lleva a cabo mediante la interacción de MEK1 a través del dominio SH3 (Pei 2000), fosforilando la proteína en el residuo Ser¹⁶², dentro de una región crítica para ejercer su capacidad transactivadora. Además existen evidencias que indican que la activación de la ruta de las MAPK guía a una translocación nuclear de la proteína PTTG1 (Pei 2000).

A su vez se ha demostrado que la subunidad Ku70, perteneciente al complejo protein-kinasa dependiente de DNA (DNA-PK) fosforila a PTTG1, bloqueando la separación de las cromátidas hermanas y ocasionando posibles aneuploidias a través de respuesta a daño de DNA. El estudio llevado a cabo por el Dr. Boelaert *et al.* publicado en el año 2004, mostró que la fosforilación constitutiva de PTTG1 ocasionaba un incremento en la capacidad de formar colonias y proliferar, señalando así la importancia de este proceso en la modulación de sus funciones.

Degradación

PTTG1 se degrada rápidamente al finalizar metafase, para asegurar la separación de las cromátidas hermanas. Este proceso también ha sido observado en sus homólogos de levaduras de gemación *pds1* (Cohen-Fix O. et al., 1996), levaduras de fisión *cut2* (Funabiki et al., 1996) y en *Drosophila Pim1* (Leismann O et al., 2000).

El complejo promotor de anafase (APC) ubiquitina a PTTG1 para asegurar su degradación, este complejo de ubiquitin ligasa formado por varias subunidades, es responsable de ubiquitinar a varias proteínas del ciclo celular (Nakayama et al. 2006). A diferencia de su homólogo de levadura *pds1*, la degradación PTTG1h está catalizada por las proteínas cdc20 y cdh1 (Zur A et al. 2001) y su degradación es dependiente de sus dos cajas de destrucción, caja D y caja KEN.

3.8 Miembros de la familia PTTG: Caracterización y perfiles de expresión

En el año 1999 surgieron evidencias de la existencia de más de un homólogo del gen *hpttg1*, identificándose una isoforma sin intrones que mapeaba en el cromosoma 4p12 y que se nombró como *hpttg2* (Prezant TR et al. 1999). El gen *hpttg2* comparte el 94% de homología de nucleótidos con el cDNA de *hpttg1* y el 91% de amino ácidos idénticos. Posee una región codificante de 606pb, que da lugar a una proteína de 202 aa y conserva los dos motivos ricos en prolina en el extremo C-terminal. Estos dos dominios son también conservados en una tercera isoforma nombrada como *hpttg3*, que mapea en el cromosoma 8q13.1 y cuya secuencia codificante está formada por 606pb, que dan origen a una proteína de 202aa y presenta una homología del 89% y del 84% con PTTG1 y PTTG2 respectivamente (Chen et al. 2000).

Mediante diversas técnicas se han detectado niveles bajos de RNAm de Pttg2 en testículo, ovario, bazo, próstata, intestino delgado y colon, además de hígado, hipófisis y algunos tumores (Prezant et al 1999, Chen et al. 2000). Sin embargo, PTTG3 presenta niveles extremadamente bajos o ausentes en estos tejidos, siendo únicamente detectado en tumores de ovario y en las líneas SKOV3 y PAI (Chen et al. 2000). La función fisiológica de ambas isoformas es aún incierta, aunque recientes estudios proponen a PTTG2 como modulador de la transición epitelio mesénquima (ETM) en la línea HCT116 (Méndez-Vidal C. et al., 2013).

4. Funciones de PTTG1

4.1 Función securina/ Replicación

La correcta segregación de los cromosomas durante la mitosis es llevada a cabo por la separación de las cromátidas hermanas de forma controlada. Securina juega un papel importante en el mantenimiento de la unión de las cromátidas hermanas hasta el comienzo de anafase (Michaelis C et al. 1997). Durante metafase, las parejas de cromátidas hermanas son mantenidas juntas por el complejo multisubunidad “cohesina”, que requiere la

actividad de cuatro proteínas llamadas Smc1, Smc3, Scc1 y Scc3 y ciertas variantes de anillos largos de cohesina. Esta familia de proteínas ATPasas que están asociadas a los cromosomas, ejercen una fuerza cohesiva que se opone a la separación de los cromosomas inducida por los microtúbulos (Michaelis C et al. 1997; Gimenez-Abian JF. Et al., 2004). Scc1p se une a los cromosomas durante la fase S y se disocia al comienzo de anafase por mediación de separasa. Durante la mayor parte del ciclo, securina se une a separasa e inhibe así su actividad proteolítica (Hornid NC et al. 2002, Vlotides G. et al 2007; Jeffares KB. et al., 2006). En la transición metafase anafase, securina es señalada para su degradación por la ubiquitin ligasa APC (Complejo promotor de anafase); la destrucción de securina permite liberar de su inhibición a separasa, la cual procede a la degradación del complejo cohesina. Por otro lado, securina es importante para asegurar la acumulación de la forma inactiva de separasa en el núcleo y evitar su activación en otras fases del ciclo (King RW et al. 1995; Dai J. et al., 2006; Gorr IH. Et al., 2005). El APC, también nombrada como ciclosoma es un complejo ubiquitin ligasa (E3) formado por diferentes subunidades que está encargada de ubiquitinar ciclinas mitóticas, securina y otras proteínas del ciclo celular (Sudakin V et al. 1995, Zou H et al. 1999; Holland AJ. Et al., 2007; 2006; Kumada K. et al., 2006).

Además a su función securina, se observó que PTTG1 y el factor de transcripción Sp1 median de forma cooperativa la transición de la fase G₁/S (Tong et al. 2007; Clem AL. et al., 2003). El complejo PTTG-Sp1 colocaliza en el promotor ciclina D3 (CCND3) en células JEG-3 y HCT116, provocando un incremento de la fase G₁ y decrecimiento de la fase S en células tratadas con siRNA de Sp1 o PTTG. En el año 2007, Chesnokova et al. mostraron que PTTG también se unía a la región promotora de p21 vía Sp1 resultando en una supresión de la actividad de p21, otorgando importancia a los factores de transcripción en los mecanismos neoplásicos, incluyendo apoptosis, angiogénesis y metástasis (Xie et al. 2006).

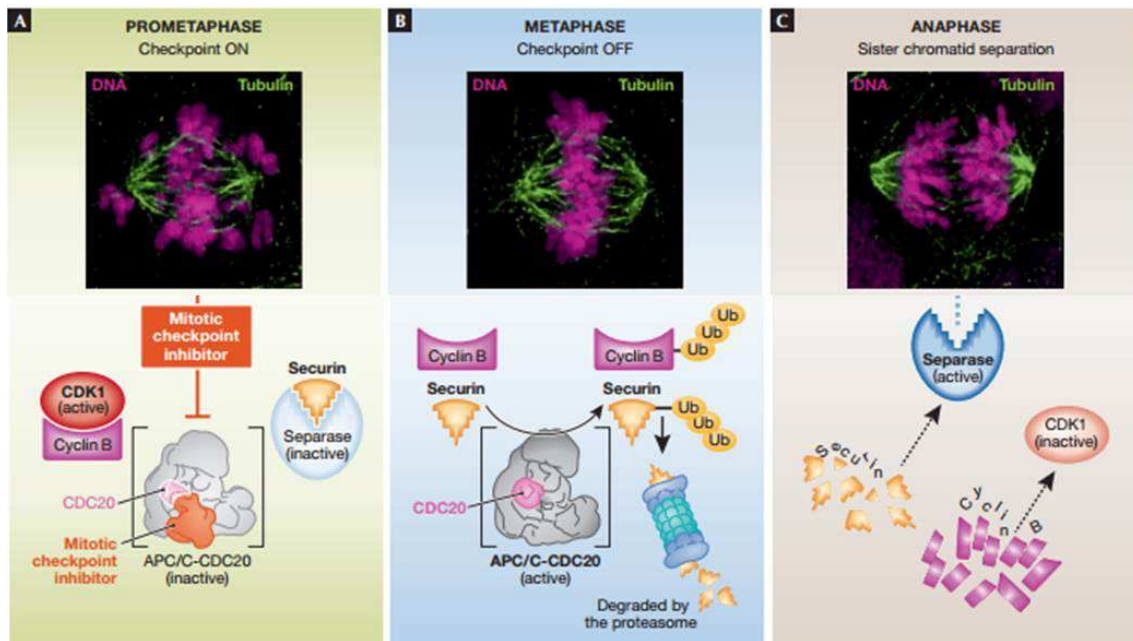


Figura 5. Representación del mecanismo de regulación del checkpoint mitótico, (A) Mecanismo que evita la mala segregación y aneuploidias de los cromosomas. (B) Silenciamiento del checkpoint de mitosis ubiquitinando securina y ciclina B1, que serán degradadas por el proteasoma. (C) Liberación de separasa y rotura de las cohesinas. (Andrew J. Hollando y Don W. Cleveland, 2012).

4.2 Daño y reparación de DNA

En células de mamífero PTTG1 se une a Ku-70, que es la subunidad reguladora de DNA-PK, una enzima envuelta en la reparación de la rotura de doble cadena de DNA.

Se ha observado que DNA-PK fosforila a PTTG1 *in vitro*, bloqueando la separación de las cromátidas hermanas, y que la unión de PTTG1 a Ku-70 es inhibida por la rotura de doble cadena de DNA, quedando entonces libre y activa esta subunidad, la cual puede ahora potenciar la asociación de DNA a DNA-PK; implicando a hPTTG1 en la unión entre rutas de respuesta a daño de DNA y segregación de cromátidas hermanas, retrasando la mitosis mientras se procede a la reparación de la doble hélice (Romero F. et al., 2001).

En células HCT116 y fibroblastos transfectadas con PTTG1, se indujo daño de DNA de doble cadena y se observó una bajada de la función de Ku-70, sugiriendo que PTTG1 media la inhibición de la actividad Ku-70 (Kim et al. 2007 a).

Paralelamente, se ha observado que en células madre de médula (Rubinek et al. 2007) y en células de glándula de pituitaria (Chesnokova et al.

2007) carentes de PTTG1, los genes involucrados en las rutas de reparación y daño a DNA aparecen desregulados, señalando el posible papel de PTTG1 en la supresión de estas rutas.

Estudios llevados a cabo por Bernal et al., han demostrado que la pérdida de PTTG1 en cultivo celular, guía a una disminución de la proliferación celular después de estrés genotóxico (Bernal et al. 2008; Lai Y. et al., 2007) aportando una explicación racional al hecho de que PTTG1 aparezca sobreexpresado en numerosos tipos de cáncer.

4.3 Elementos de unión a PTTG1

Se han demostrado interacciones físicas y uniones de PTTG1 con varios factores. Entre ellos se encuentran S10, que es una proteína ribosomal, HSJ2 (proteína de choque térmico J2) que es un homólogo humano de DnaJ, Ku-70 que es la subunidad reguladora de DNA-PK y c-myc que es un importante mediador de la proliferación celular (Pei 1999, 2001, Romero et al 2001, Hamid & Kakar 2004). S10 es constitutivamente expresado y asociado con ribosomas, mientras que HSJ2 es un homólogo de DnaJ humano que media la disociación de varios complejos de proteínas (Pei 1999). Es posible que S10 y DnaJ regulen la asociación y disociación ribosomal de PTTG1 por interacción directa con su dominio C-terminal (Pei 1999). La interacción de PTTG1 y Ku-70, ha sido demostrada ampliamente mediante ensayos *in vitro* e *in vivo*, ejerciendo una función en la reparación de daño a DNA de doble cadena.

Interacción	Efecto
Separasa	Regulación de la actividad separasa
PBF	Traslocación nuclear de PTTG1
MEK-1	Regulación de la función transactivadora de PTTG1
Ku-70	Regulación de la reparación de rotura de dsDNA
APC	Degradación de PTTG1
Sp1	Regulación de la expresión de CCND3 y transición fase G ₁ /S
p53	Inhibición de la actividad transcripcional de p53 e inducción de muerte celular
DnaJ (HSJ2)	Desconocido
S10	Desconocido
dsDNA, DNA de doble cadena	

Tabla 4. Interacciones descritas de PTTG1 (Adaptado de Vlotides et al. 2007)

4.4 Actividad transactivadora

La estructura de PTTG1 y particularmente su dominio C-terminal, correlaciona con un dominio de transactivación en muchos eucariotas, además su localización nuclear, incitó al grupo de Domínguez et al. a comprobar su capacidad transactivadora (Domínguez et al. 1998).

Análisis de delección y mutagénesis en el extremo C-terminal, sugirieron la importancia de su estructura tridimensional en esta función, y señalaron como sitios clave de contacto para la su capacidad transactivadora los residuos P¹³⁹, S¹⁵⁹, P¹⁵⁷-P-S-P, y L¹²⁰-D-F-D-L¹²⁴ localizados entre los aminoácidos 119 y 164 (Wang & Melmed 2000, Pei 2000).

PTTG1 contiene un sitio de fosforilación consenso de MAPK (P-X-S/T-P) en su dominio de transactivación, que es fosforilado por MAPK en S¹⁶² *in vitro*, y que es crítico para ejercer su función transactivadora. Además, PTTG1 interacciona directamente con MEK1 a través del motivo de unión SH3 en el dominio N-terminal, esta interacción es necesaria para mediar el efecto de MAPK en la función transactivadora de PTTG1 (Pei 2000).

Mediante la elaboración de líneas celulares inducibles para la expresión de PTTG1 y el uso de arrays de DNA, se detectó que en condiciones de sobreexpresión de PTTG1, aumentaba la expresión de otros genes como c-myc, protein kinasa C β -1, MEK1, MEK3 y HSP70 (Pei 2001). El incremento de expresión de c-myc, tras inducción con *pttg1*, se produce por unión al promotor de este oncogén cerca del sitio de inicio de la transcripción (Pei 2000).

Otro blanco de PTTG1 es el factor angiogénico de crecimiento de fibroblastos (FGF-2). PTTG1 y FGF-2 aparecen sobreexpresados en hipófisis (Zhang et al. 1999, McCabe et al. 2003, Heaney AP. et al. 1999), en tiroides (Boelaert et al. 2003), tumores de ovario (Puri et al. 2001) y miomas uterinos (Tsai et al. 2005). Experimentos *in vitro*, han mostrado la inducción del RNAm de FGF-2 por sobreexpresión de PTTG1 en varios tipos celulares, entre ellos NIH3T3 (Zhang et al. 1999, Ishikawa H. et al 2001), células primarias de tiroides (Boelaert K. et al. 2004), células neuronales fetales humanas NT2, células JEG-3 y células MCF7 (McCabe et al 2002). Además ha sido bien establecida la correlación entre la sobreexpresión de PTTG1 y la inducción de VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) (Hunter et al. 2003), la inducción

de varias metaloproteinasas entre las que se encuentran MMP2 (Malik MT and Kakar, 2006) y recientemente parece estar también MMP14 (Hui P. et al., 2015) y de manera indirecta, PTTG1 también actúa sobre p53 a través de c-myc (Hamid and Kakar, 2004; Espina AG., 2010).

La coexpresión de PTTG1 y PBF aumenta significativamente la capacidad transactivadora de PTTG1, siendo necesario PBF para la activación transcripcional de FGF-2 por PTTG1. Además PTTG1 regula la expresión de prolactina y genera un incremento de la expresión de RNAm de somatotropina GH en células GH3 (Horwitz et al. 2003).

Mediante tecnología de inmunoprecipitación de cromatina (Chip-on-chip) se ha estudiado la acción de PTTG1 sobre 20.000 genes. De 700 promotores de genes, significativamente enriquecidos por la inmunoprecipitación con el anticuerpo de PTTG1, alrededor de 400 fueron identificados y clasificados en tres principales grupos funcionales envueltos en ciclo celular, control metabólico y ruta de transducción de señales (Tong et al. 2007).

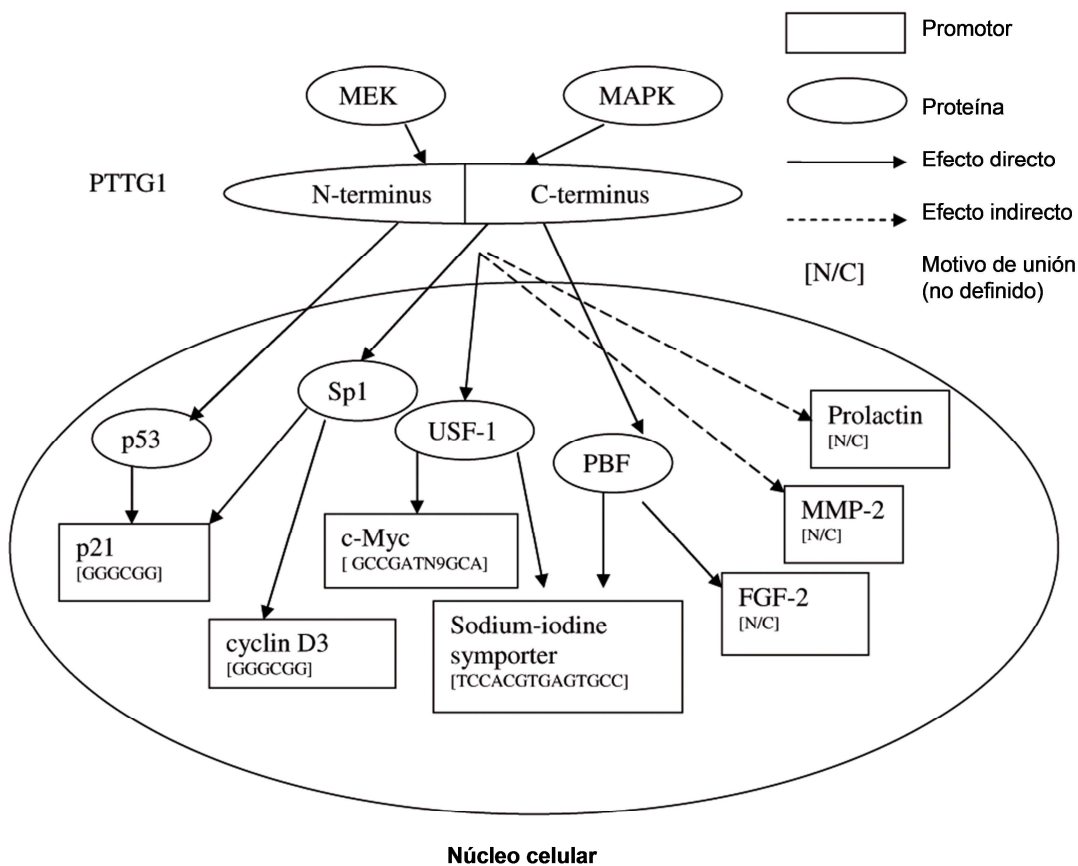


Figura 6. Rutas de transactivación de PTTG1 (Adaptada de Tong and Eigler, 2009).

4.5 Proliferación Celular

Desde que PTTG1 fue aislado y caracterizado, han sido más de 900 publicaciones científicas las que han establecido la participación de PTTG1 en varios tipos de cáncer. Muchos de estos estudios se han enfocado en determinar el mecanismo y la ruta por la cual PTTG1 ejerce su función tumorigénica. El efecto de PTTG1 en la proliferación celular, crea aún controversias, debido a que como proteína oncogénica, se espera que ejerza un papel pro-proliferativo mientras que por otro lado como securina actúa inhibiendo la división celular y por tanto la proliferación hasta el momento de su degradación (Vlotides et al 2008; Mei J. et al., 2001). Pei y Melmed mostraron que la sobreexpresión de PTTG1 de rata en fibroblastos de ratón NIH3T3, inhibía la proliferación celular e inducía transformación *in vitro* (Pei & Melmed 1997). Por otro lado, Kakar & Jennes (Kakar & Jennes 1999) y Hamid et al. (Hamid et al. 2004) mostraron que la sobreexpresión de PTTG1 humano en células NIH3T3 y en células embrionarias de riñón humanas HEK293, provocaba un incremento de la tasa de proliferación, una inducción de la transformación celular y desarrollo de tumores en ratones atímicos, sugiriendo la función oncogénica de PTTG1 en tumorigénesis humana .

El impacto que ejerce el nivel de PTTG1 transfectado fue probado en células NT2. Un incremento de PTTG1 relativamente bajo (entorno 1,7 veces) estimulaba la proliferación celular y sin embargo un incremento de PTTG1 mayor (alrededor de 6 veces) inhibía la proliferación celular (Boelaert et al. 2003).

Es importante remarcar, que el estado de fosforilación de PTTG1 también está envuelto su efecto pro o antiproliferativo (Boelaert et al. 2004). Así, la habilidad de cada sistema celular para realizar modificaciones posttranscripcionales de PTTG1 exógeno puede influir en el resultado de la sobreexpresión sobre la proliferación celular.

4.6 Transformación celular e inestabilidad cromosómica

A diferencia de la controversia que existe sobre el efecto de la sobreexpresión de PTTG1 en proliferación celular, su capacidad para transformar las células ha sido bien establecida tanto *in vivo* como *in vitro*. Mediante ensayos en agar blando, se observó que las células NIH3T3 y HEK293 transfectadas con PTTG1, formaban mayor número de colonias que dichas líneas transfectadas con la construcción control (Pei & Melmed 1997, Hamid et al. 2005). En la línea celular de carcinoma de pulmón H1299, la disminución de los niveles de PTTG1h genera una disminución en la formación de colonias en agar blando (Malik MT. & Kakar 2006). *In vivo*, la inyección subcutánea de células NIH3T3 o células HEK293 transfectadas con PTTG1, generan formación de tumor en ratones atímicos desnudos (Zhang et al. 1999, Hamid et al 2005).

La ruta de separación de las cromátidas hermanas es crítica para prevenir aneuploidias en las células, que puedan finalmente guiar hacia la aparición de cánceres (Kinzler et al. 1996). La asociación entre la sobreexpresión de PTTG1 y el incremento de aneuploidias e inestabilidad genética en tumores y líneas celulares ha sido bien establecido en pacientes con cáncer colorectal, en melanomas, carcinoma de tiroides y células Hela y A549 (Mu et al 2003, Yu et al 2003, Kim et al. 2005, 2007c; 2007 a; Winnepeninckx et al.2006; Christopoulou L. et al., 2003).

Diversas evidencias sugieren que la inducción de inestabilidad cromosómica y aneuploidías son un importante mecanismo de transformación consecuencia de la sobreexpresión de PTTG1. La realización de ensayos de imagen *in vivo* en la línea celular de cáncer de pulmón H1299, transfectada con PTTG1-EGFP, que es deficiente en p53 y niveles indetectables de PTTG1 endógeno, llevó a Yu et al. a demostrar que la acumulación de PTTG1, tanto por sobreexpresión como por fallos en la degradación, inhibían la progresión de la mitosis y la segregación cromosómica, pero no afectaba a la citoquinesis, dando lugar a aneuploidías (Yu et al. 2003).

En el año 2001, Jallepalli et al. confirmaron la importancia de PTTG1h para la estabilidad cromosómica en la línea celular de cáncer de colon

HCT116, que posee cariotipo estable y checkpoints del spindle y daño a DNA intactos (Lengauer et al.1997). La inactivación de PTTG1h en células HCT116 por recombinación homóloga, resultó en una pérdida frecuente de cromosomas, unido a anafases anormales durante las cuales, las células sufrían segregación cromosómica incorrecta. Las mitosis anormales debidas a la falta de actividad de PTTG1 eran asociadas con defectos en la activación de separasa y disminución de la eficiencia de rotura de la subunidad Scc1 de cohesina (Jallepalli et al. 2001).

Sorprendentemente en el año 2005 Pflieger et al. llevaron a cabo la inactivación PTTG1h de forma similar en células HCT116 y observaron que la pérdida de cromosomas era transitoria, ocurriendo en el 60% de los casos durante los tres primeros pases, y reduciéndose de forma progresiva hasta alcanzar un cariotipo idéntico a las células parentales. Sin embargo, persistía la reducción de la actividad separasa y la rotura de la cohesina Scc1. HCT116sec-/- eran cromosómicamente estables y llevaban a cabo mitosis normales, sugiriendo la existencia de mecanismos adicionales compensatorios en la segregación cromosómica de células humanas (Pflieger et al. 2005).

4.7 Angiogénesis, metástasis y ETM

La inducción de los niveles de PTTG1 coincide con la inducción del factor de crecimiento de fibroblastos bFGF y del factor de crecimiento de endotelio vascular VEGF (Heaney et al 1999). Estos factores de crecimiento son conocidos por modular la angiogénesis en numerosos tejidos, su inducción por parte de PTTG1 sugiere la participación de este gen en el proceso de angiogénesis. Ishikawa et al. mostraron que el medio de cultivo recogido de células NIH3T3 transfectadas con PTTG1h, era capaz de inducir angiogénesis (Ishikawa et al. 2001). La desregulación de VEGF, a su vez puede modificar a otro gen con función angiogénica conocido como inhibidor de DNA binding-3 (ID3), el cual se cree que juega un papel crítico en la proliferación celular y como precursor de reclutamiento endotelial (Lasorella et al. 2001; Minematsu T. et al., 2006). Recientemente, Kim et al. demostraron la supresión del inhibidor angiogénico trombospodina-1 (TSP-1) por PTTG1 (Kim et al. 2006). El

mecanismo por el cual PTTG1 regula la expresión de TSP-1 e ID-3 no está claro, proponiendo tanto mecanismos de actuación directos como indirectos, sin quedar establecido a través de que ruta PTTG1 ejerce este efecto (Kim et al. 2006). Estos investigadores observaron que empleando un mutante de PTTG1 en el dominio SH-3, el efecto de PTTG1 sobre ID-3 se reducía, sugiriendo un importante papel de este dominio en la regulación de la expresión de ID-3 (Kim et al. 2006). Previamente, se había descrito que el dominio SH-3 de PTTG1 estaba implicado en la desregulación de FGF y de VEGF (McCabe et al 2002, Boelaert et al 2004). A través de todas estas observaciones, los investigadores pudieron concluir que PTTG1 promueve la angiogénesis del tumor a través de la regulación de la expresión de genes pro-angiogénicos (Panguluri et al. 2008).

La desregulación de PTTG1 es frecuente en tumores humanos y parece estar envuelta al menos en los primeros estadios del proceso metastático. Diversos estudios han revelado la correlación entre la sobreexpresión de PTTG1 y metástasis en mama, colon, pulmón y próstata (Zang et al. 1999 a, Heaney et al. 2000, Ramaswamy et al. 2003, Solbach et al 2004, Wen et al. 2004, Yan et al. 2009).

Shibata et al. examinaron los niveles de expresión de PTTG1 en cáncer esofageal, observando un significativo aumento de los niveles de RNAm de Pttg1 en tejido tumoral con respecto a tejido sano (Shibata et al. 2002), estableciendo además una correlación entre el estado patológico y aparición de metástasis en nódulos linfáticos (Shibata et al. 2002).

Solbach et al. realizó un estudio, analizando 72 muestras de tumores primarios de pacientes con cáncer de mama y epitelio mamario normal para medir los niveles de RNAm de Pttg1, mediante el cual, pudieron establecer una correlación entre los niveles de PTTG1 y la infiltración en nódulos linfáticos, alto grado de recurrencia del tumor y agresión (Solbach et al 2004). Resultados similares se obtuvieron con muestras de tumores primarios de 89 pacientes que sufrían carcinoma escamoso celular (Solbach et al. 2006).

Para comprender un poco mejor el mecanismo de actuación de PTTG1 en angiogénesis y metástasis, Malik y Kakar realizaron un estudio de la regulación de las enzimas proteolíticas MMPs por parte de PTTG1, que son requeridas por las células para invadir y metastatizar (Malik MT. & Kakar 2006).

Las MMPs desempeñan un papel clave en la degradación de la membrana basal y

la matriz celular. Entre estas, MMP-2 y MMP-9 son las responsables de romper el componente estructural principal de la membrana basal. La regulación de MMP-2 por parte de PTTG1, podría ser uno de los mecanismos propuestos por el que PTTG1 contribuye al proceso angiogénico y metastásico (Heaney et al. 2000, Ramaswamy et al. 2003).

En los últimos años, diversas publicaciones han establecido una relación entre los niveles de PTTG1 y la transición epitelio-mesenquima (EMT). En la línea celular de carcinoma oral escamoso (SCC15), la elevada expresión de PTTG1 potencia la transición EMT, acompañada de una bajada de los niveles de proteína de E-cadherina e incremento de los niveles de snail y vimentina (Zhang E. et al., 2014). Otro estudio en el año 2011, sobre la línea tumoral de epitelio de ovario (A2780), ya levantó sospechas sobre que la sobreexpresión de PTTG1 incrementaba los niveles de TGF β , Twist, Snail, Slug y vimentina y bajaba los niveles de E-cadherina. En condiciones de represión de PTTG1 se observaba el efecto contrario (Shah PP. et al., 2011). Un año más tarde, este mismo grupo demostró que PTTG1 inducía la EMT a través de la activación de integrina α V β 3 y su asociación con la ruta de la quinasa de adhesión focal (FAK) para cáncer de pulmón (Shah PP. et al., 2012), sugiriendo el importante papel de PTTG1 en el proceso de EMT (Lee JM. Et al., 2006).

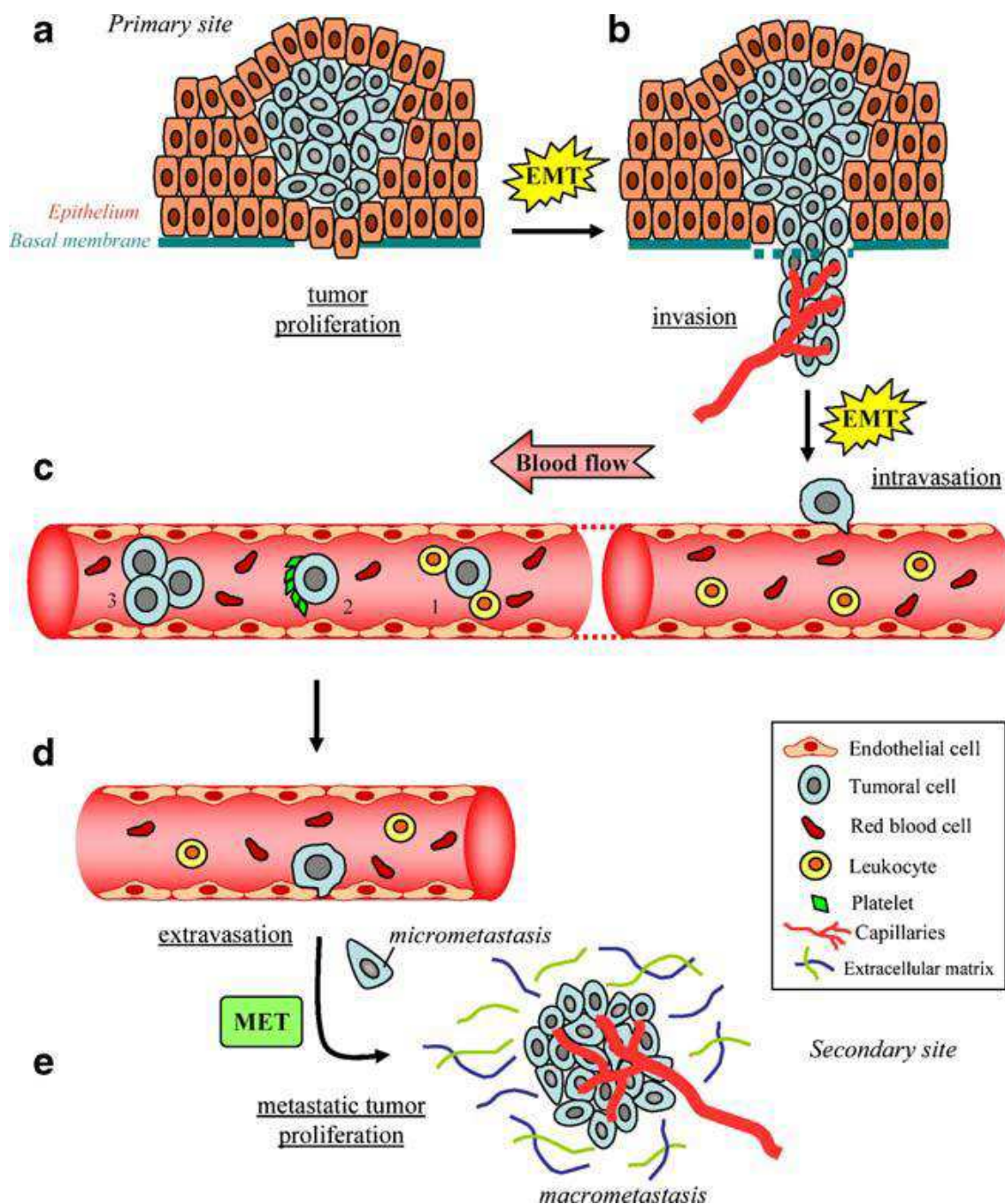


Figura 7. El viaje de una célula metastásica: desde el nicho primario hasta el nicho secundario, las células tumorales tienen un largo y difícil camino antes de conseguir su meta. Este camino comprende desde la proliferación descontrolada (a), invasión local de células que se han separado, (c) intravasación en capilares y supervivencia en el torrente sanguíneo (1. Interacción con leucocitos que pueden destruirla o no; 2.interacción con plaquetas que minimizan el estrés mecánico; 3. Unión de células tumorales), (d) parada y extravasación en el órgano diana y metástasis en el nuevo microambiente.

4.8 PTTG1 y Apoptosis

Se ha demostrado que PTTG1 se asocia a la proteína p53 (Bernal et al 2002) y que dicha asociación bloquea la unión de p53 al DNA. Sobre el papel que ejerce PTTG1 en la apoptosis existe gran controversia, enfrentando a dos vertientes de investigadores que apoyan teorías opuestas. Por un lado, se han presentado trabajos que indican que PTTG1 induce apoptosis en tanto en células que expresan p53 silvestre (Yu et al. 2000 a) como en células deficientes en p53 (Yu et al. 2000 a). Sugiriendo que ejerce un papel dual en la apoptosis de forma dependiente e independiente de p-53(Panguluri et al. 2008).

La transfección con PTTG1 de la línea celular embrionaria de riñón que presenta p53 silvestre, mostró incremento de los niveles de la proteína p53 y apoptosis, sin embargo este efecto no se detectó en la transfección en células PC-3 mutantes para p53 (Hamid & Kakar 2004). El análisis del promotor de p53 mostró aumento de la actividad en células MCF-7, PC-3 y HEK295, relacionando su actividad transcripcional con PTTG1 (Hamid & Kakar 2004). De forma adicional, la transfección de PTTG1 generaba un aumento de la expresión del gen pro-apoptótico Bax de manera dependiente de dosis en células MCF7 y HEK293. De forma contraria, no se observaron cambios en la expresión de Bax en células PC-3 carentes de p53 funcional, sugiriendo que la modulación de los factores pro-apotóticos por parte de PTTG1 ocurre a través de p53 (Salehi et al. 2008).

Por el contrario, otra vertiente apoya la teoría contraria. En la línea celular Hela, la bajada de los niveles de PTTG1 a través de siRNA potencia la apoptosis cuando las células son irradiadas con UV y la sobreexpresión de PTTG1 suprime la apoptosis inducida por UV en estas células (Lai et al. 2007; Bernal & Hernandez 2007). De modo similar, la transfección de células de hepatoma con siRNA contra PTTG1 activa p53 e induce apoptosis (Cho-Rock et al. 2006). En células de adenocarcinoma de colon, la depleción de PTTG1 resulta en un efecto citotóxico dependiente de p53 (Cho-Rock et al. 2006). Estos resultados sugieren que PTTG1 puede ejercer su efecto oncogénico al menos en parte afectando a rutas dependientes de p53 (Bernal et al 2002).

5. Microambiente del tumor

Durante la última década, cada vez más, los tumores han sido reconocidos como órganos cuya complejidad puede ser igual o superior a la de tejidos sanos. Cuando se ve desde esta perspectiva, la biología de un tumor sólo puede entenderse mediante el estudio de los distintos tipos de células especializadas dentro de él, así como el “microambiente tumoral” que se construye durante el curso de las etapas de la tumorigénesis. Esta descripción contrasta con la antigua visión reduccionista de un tumor, como nada más que una colección de células cancerosas, relativamente homogénea, cuyo completa comprensión de su biología podría ser entendida al dilucidar las propiedades individuales de estas células. Existen un conjunto de diversos tipos de células que contribuyen a la biología del tumor, a través de señalizaciones y funciones tanto individuales y como colectivas (Douglas H. and Weinberg R.A., Cell, 2011). Este conjunto de células forman el parénquima del tumor, compuesto por células tumorales y el estroma del tumor, constituido por una variedad de células no neoplásicas, que pueden proceder de tejidos vecinos o derivar de progenitores reclutados de la médula ósea. Entre las células del estroma encontramos células endoteliales, células inflamatorias del sistema inmune, pericitos, fibroblastos asociados al tumor y un componente no-celular, la matriz extracelular (ECM). La comunicación entre parénquima y estroma es clave para el desarrollo del tumor (Fig. 8).

5.1 Células cancerígenas

Las células cancerosas son las fundadoras de la enfermedad, que inician y dirigen el avance de la progresión del tumor, portando mutaciones que definen al cáncer como enfermedad genética. Constituyen el parénquima del tumor. Tradicionalmente, ha sido considerada como una población relativamente homogénea, hasta etapas tardías de su progresión, donde la hiperproliferación combinada con la inestabilidad genética daba lugar a subpoblaciones clonales. En los últimos años, se han acumulado evidencias de la presencia de una subclase de células neoplásicas en el tumor, conocidas como células madre del cáncer (*cancer stem cells*, CSCs) (Cho and Clarke, 2008; Lobo et al. 2007). Estas células poseen características y marcadores

propios de células madre normales y aparecen particularmente en carcinomas de mama y tumores neuroectodérmicos (Al-Hajj et al., 2003; Gilbertson and Rich, 2007). Recientes investigaciones han relacionado la adquisición de rasgos CSCs con el programa de transdiferenciación epitelio-mesénquima (EMT) (Singh and Settleman, 2010; Mani et al., 2008; Morel et al., 2008; Hollier BG. et al., 2009). La activación de este programa en algunos sistemas modelo puede inducir características consideradas de CSCs, incluido autorenovación y fenotipo antigénico. Esta diversificación genética puede permitir especialización funcional, produciendo subpoblaciones de células que contribuyen de forma distinta y complementaria, al beneficio general del crecimiento del tumor (Huber MA. Et al., 2004^a; 2004b; 2005; Hugo H. et al., 2007).

5.2 Células endoteliales

Gran parte de la heterogenicidad celular que se encuentra en los tumores proviene del estroma, donde hay que destacar las células endoteliales que a través de mecanismos de diferenciación, desarrollo y homeostasis, forman las arterias, venas y capilares. De gran importancia fue el concepto de “interruptor angiogénico”, que activa células endoteliales quiescentes, causando en ellas la entrada en un programa biológico que le permite construir nuevos vasos sanguíneos. Durante la última década, se han establecido nuevos ligandos y receptores que participan en esta red de comunicación a la que pertenecen VEGF y FGF (Pasquale et al., 2010; Ahmed and Bicknell, 2009).

5.3 Periocitos

Los periocitos son células contráctiles que envuelven a las células endoteliales de los capilares y vénulas en todo el cuerpo. En tejido normal, estas células colaboran en sintetizar la membrana basal del endotelio y le proporcionándole una señalización paracrina. Se encargan de mantener la correcta homeostasis de los vasos sanguíneos. Una hipótesis interesante, aún pendiente de ser completamente justificada, es que los tumores con baja cobertura de periocitos en su vasculatura, pueden ser más propensos a permitir la intravasación de células tumorales al sistema circulatorio, permitiendo su diseminación (Raza et al. 2010).

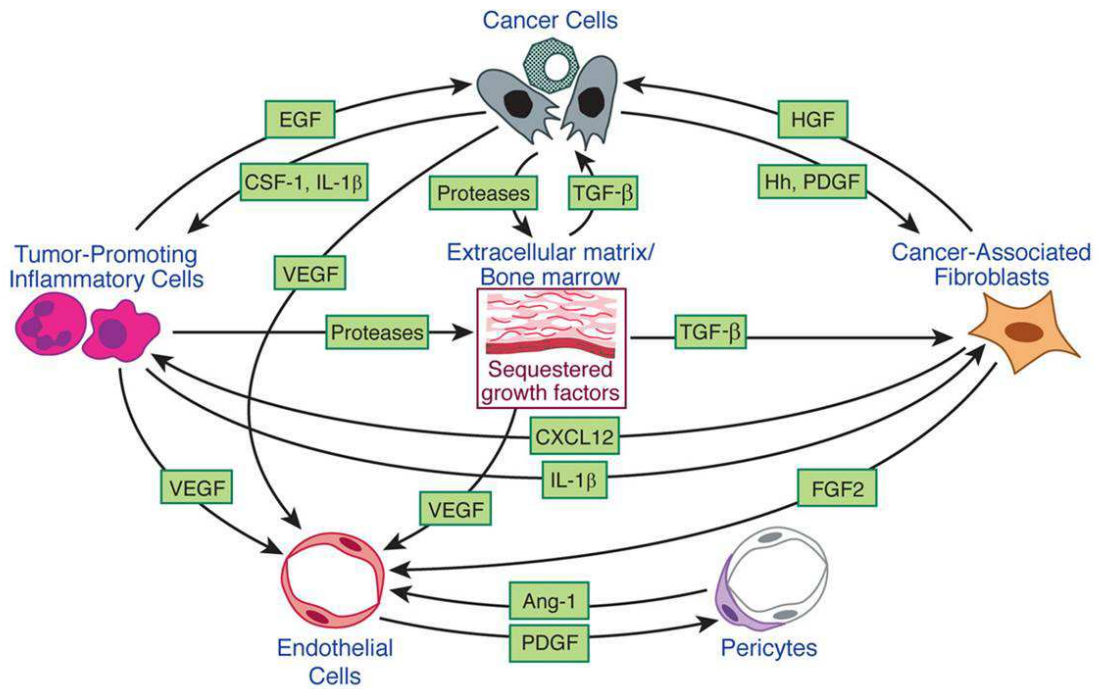


Figura 8. Mecanismos de señalización en el microambiente del tumor durante la progresión maligna. Ilustración de solo algunas señales de interacción recíprocas que llevan a cabo los distintos componentes celulares que forman el microambiente del tumor.

5.4 Células inflamatorias del Sistema Inmune

Durante una herida o infección normal, las células inflamatorias del sistema inmune aparecen transitoriamente y después desaparecen, por el contrario, su persistencia en sitios de inflamación crónica está asociado a diversas patologías entre las que se encuentran las neoplasias (Grivennikov et al., 2010). La lista de células inflamatorias que promueven los tumores, incluye ahora a subtipos de macrófagos, mastocitos, neutrófilos, así como linfocitos B y T (Coffelt et al., 2010; DeNardo et al., 2010). Estos estudios están aportando una creciente lista de moléculas de señalización liberadas por las células inflamatorias que promueven el desarrollo del tumor. Entre ellas se encuentran el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), quimioquinas y citoquinas, además de metaloproteasas (Quian and Pollard, 2010). Se ha demostrado que las células inflamatorias infiltradas en el tumor inducen y ayudan a mantener la angiogénesis, estimulan la proliferación de

células tumorales y facilitan la invasión y metástasis (Coffelt et al., 2010; Quian and Pollard, 2010).

5.5 Fibroblastos asociados al tumor

Los fibroblastos son en muchos casos, la población de células predominantes en el estroma del tumor. Debido a la variedad de componentes de la matriz extracelular que secretan, están muy implicados en la composición del estroma, que caracteriza a muchos carcinomas avanzados. Se ha demostrado que potencian el fenotipo del tumor, la proliferación de las células tumorales, la angiogénesis, invasión y metástasis. En la actualidad, el amplio espectro de funciones a través de las cuales contribuyen en la patogénesis del cáncer es aún desconocido (Dirat et al., 2010; Bhowmick et al. 2004; Bhowmick NA. Et al., 2007; Kalluri R. et al., 2006).

5.6 Componente no celular (ECM)

El microambiente local o nicho de las células tumorales juega un papel importante en el desarrollo del tumor. El mayor componente del nicho es la matriz extracelular (ECM), una compleja red de macromoléculas con distintas propiedades físicas, bioquímicas y biomecánicas. Aunque estrictamente controlado durante el desarrollo y la homeostasis de órganos, el ECM está normalmente desregulado e incluso desorganizado en enfermedades tales como el cáncer. Un ECM anormal afecta a la progresión del cáncer promoviendo su transformación y metástasis. Además, estas anomalías desregula el comportamiento de las células del estroma, facilitando la infiltración y angiogénesis asociada al tumor y contribuyendo a crear un microambiente tumoral. La comprensión de como la composición del ECM se mantiene y desregula influenciando la progresión tumoral, podría contribuir al desarrollo de nuevas dianas terapéuticas (Pengfei Lu et al., 2012; McGill G. et al., 1997).

6. Citoquinas, factores de crecimiento y cáncer

Las citoquinas, quimioquinas y factores de crecimiento son proteínas que dirigen el crecimiento celular, la proliferación, diferenciación y maduración. Existen un gran número y variedad de estas proteínas, cada grupo capaz de promover su propio grupo de funciones biológicas, desde específicas hasta genéricas, en muchas ocasiones superpuestas. Las citoquinas son proteínas secretadas, que juegan un importante papel en la respuesta inmune e inflamatoria, en proliferación, comunicación intercelular y muerte. Las quimioquinas son pequeñas citoquinas que atraen y reclutan otras células hacia un área focalizada para ejercer sus efectos biológicos. Los factores de crecimiento incluyen ambas citoquinas y hormonas proteicas, que estimulan la proliferación, diferenciación y maduración de células diana (Derynck R. et al., 2007; Egeblad M. et al., 2002; Grände M. et al., 2002; Levy L. et al., 2006).

La relación entre pttg1 y el factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF) fue descrita por CJ. McCabe y colaboradores, demostrando que la sobreexpresión de PTTG1 guiaba hacia un incremento de la secreción y expresión de bFGF, VEGF y IL-8 (McCabe CJ. et al., 2002; Tariq Hamid et al., 2005; Ishikawa et al. 2001).

De gran interés resulta el gen TGFb2 codifica para un miembro del factor transformante de crecimiento beta, familia de las citoquinas, las cuales dan lugar a péptidos multifuncionales que regulan proliferación, diferenciación, adhesión, migración y otras funciones en muchos tipos celulares, a través de la transducción de señales, mediante la interacción con sus receptores y posterior activación de sus efectores las proteínas SMAD. La desestabilización de la ruta TGFb/SMAD ha sido implicada en una variedad de cánceres humanos.

Queremos destacar el papel de IGFBP6 que es conocida como proteína de unión al factor de crecimiento como insulina-6 (IGFBP6), cuya función es inhibir la proliferación a través de la regulación de los factores de crecimiento como insulina (IGFs). En la última década, IGFBP-6 ha sido relacionada con multitudes de cánceres humanos (H. Werner, 2009) y se le atribuyen funciones de inducción de apoptosis (C. Losef et al., 2010), inhibición de la proliferación y supervivencia celular a través de la modulación del proceso reparador del DNA a través de Ku80 (Gallicchio MA. et al., 2001; Losef C. et al., 2010).

6.1 Familia de las citoquinas

Las quimioquinas son citoquinas quimiotácticas (de peso molecular entre 8-17kDa) que tienen la capacidad de unirse a receptores de siete segmentos transmembrana acoplados a proteína G (GPCRs). Las quimioquinas están clasificadas en varios subgrupos en base a la presencia de variaciones en un motivo conservado de cisteína en la secuencia de la proteína madura (CC, CXC, CX3C y XC). Muchas quimioquinas se unen a múltiples receptores y la mayoría de los receptores unen a múltiples quimioquinas, sugiriendo la posibilidad de una redundancia funcional (Ali S. et al., 2007; Vindrieux D. et al., 2009; Raman D. et al., 2007). Las interacciones quimioquinas-GPCRs regulan una diversidad de rutas de transducción de señal relacionadas con quimiotaxis, activación de rutas MAPK, activación de rutas PI3K y Ras y Rho GTPasas. Es interesante observar que los receptores de citoquinas están a su vez sujetos a mecanismos de fosforilación, que a su vez, podría intervenir en su regulación (Raman D. et al., 2007; Thelen M. et al., 2008; Darnell JE. Et al., 1997).

El papel de las quimioquinas en el cáncer se dirige hacia cuatro aspectos de su actividad: (1) inducción de la infiltración de leucocitos en tumores y regulación de sus funciones inmunes, haciendo énfasis en los macrófagos asociados al tumor (CCL2 y CCL5), células T (CXCL9 y CXCL10) y células dendríticas (CCL19, CCL20 y CCL21); (2) dirigiendo las células tumorales a sitios de metástasis específicos (CXCL12-CXCR4); (3) regulando procesos angiogénicos; (4) actuando directamente sobre las células tumorales controlando sus funciones relacionadas con malignidad (*Ben-Baruch 2006*).

Dentro de esta gran familia de mediadores de señal, queremos destacar el papel que ejercen CXCL12 y CCL2. En un origen, CXCL12 se dio a conocer por su capacidad de regular la migración de células madre hematopoyéticas dentro de la médula ósea. CXCL12, se expresa ampliamente en muchos tejidos durante todo el desarrollo y sirve como quimioatrayente de las células hematopoyéticas facilitando su trans migración a través de la barrera endotelial (Xueqing Sun et al., 2010). CXCL12 se une a los receptores CXCR4 y CXCR7. Su secreción por parte de células del estroma del microambiente del tumor atrae células tumorales que expresan el receptor

CXCR4 de modo desregulado. La activación del eje CXCL12/CXCR4 regula el patrón de dispersión en la metástasis hacia órganos que expresan altos niveles de CXCL12, donde proliferarán tumores secundarios. CXCL12 tiene un amplio rango de efectos en el desarrollo del tumor, aunque su efecto principal parece ser facilitar la metástasis o la movilización de células tumorales, reclutamiento hematopoyético y establecer unas condiciones en el microambiente del tumor que favorezcan su desarrollo (Vindrieux D. et al., 2009; Raman D. et al., 2007; Xueqing Sun, Cancer Metastasis Rev. 2010; Jianhua Wang et al., 2006).

CCL2, también conocida como MCP-1, es un mediador inflamatorio que promueve el cáncer. Es conocida por reclutar monocitos y macrófagos hacia el lugar de inflamación. Un creciente número de investigaciones, sugiere que CCL2 está progresivamente sobreexpresado en el nicho del tumor, ejerciendo un papel en su progresión clínica. Células tumorales de diferente origen han demostrado tener receptores funcionales para esta quimioquina, sugiriendo que ejerce un efecto directo sobre la célula tumoral, aunque una variedad de células normales que coexisten en el microambiente del tumor, también responden a CCL2. Posee gran capacidad pro-angiogénica, además de promover migración e invasión a través de la unión con su receptor CCR2 e inducir la motilidad de leucocitos junto con CCL5. De este modo CCL2 media interacciones entre las células normales y malignas en el microambiente del tumor y juega un papel multifacético en la progresión de este (Yaeli Label-Haziv et al., Neoplasia sep 2014).

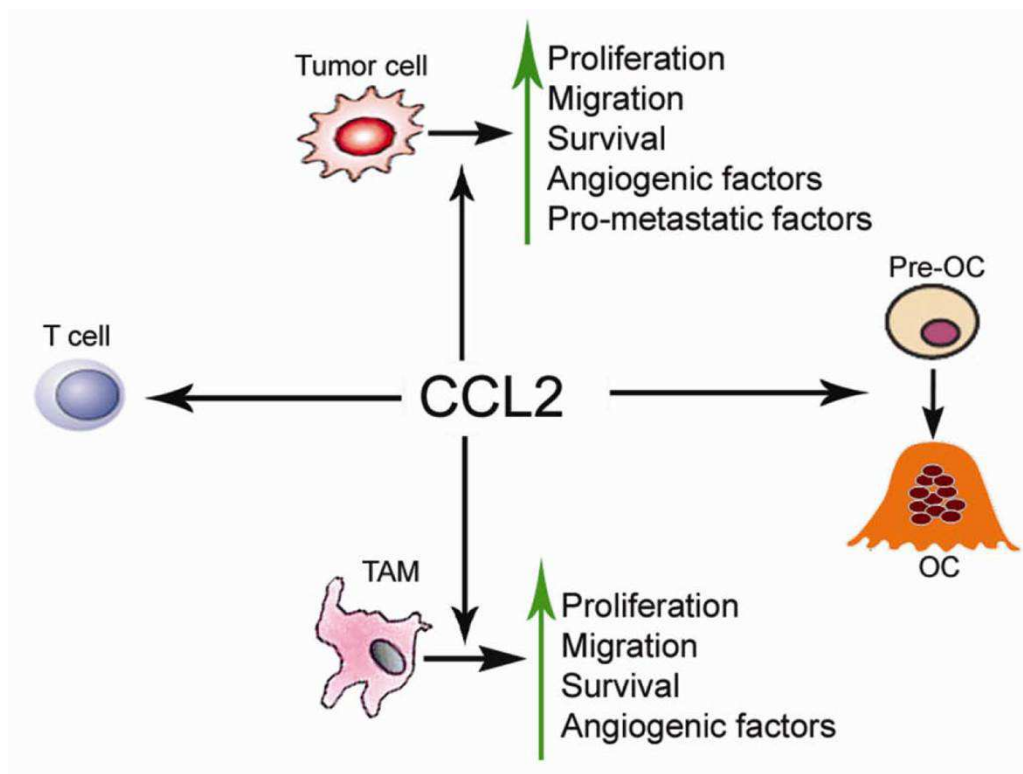


Figura 9. CCL2 es considerado como una citoquina tumorigénica debido a su efecto directo sobre células tumorales y su influencia sobre células normales. (Jian Zhang et al., Cytokine Growth Factor Rev. 2010).

6.2 Citoquinas y microambiente del tumor

Recientemente, las citoquinas y sus receptores han sido identificados como mediadores crónicos de la inflamación, el cual juega un papel clave en la iniciación y progresión de cáncer pulmón, colon, hígado, mama, cérvix, próstata, vejiga, esófago, piel y linfático (Vindrieux D. et al., 2009). El crecimiento del tumor y su diseminación es resultado de una interacción dinámica entre las células tumorales y su microambiente, considerándose a las citoquinas como los mediadores clave no sólo para dirigir hacia los sitios de metástasis, sino que también actúan reclutando diferentes tipos celulares hacia este microambiente, tales como macrófagos (TAMs), neutrófilos TANs), linfocitos, fibroblastos (CAFs), células madre mesenquimales y células endoteliales. Esta infiltración de células presenta una fuente secundaria de citoquinas que afectan al crecimiento del tumor, supervivencia, senescencia, angiogénesis y metástasis (Raman D. et al., 2007; Sánchez- López E. et al., Oncogene 2015).

7. Migración celular y Adhesión focal

La capacidad de las células para migrar *in vivo* es necesaria para multitud de procesos fisiológicos, incluidos el desarrollo embrionario, la homeostasis del tejido y la cicatrización de heridas (“wound healing”). A su vez, la migración celular, también está implicada en condiciones patológicas tales como inflamación y metástasis del cáncer. La habilidad de las células tumorales para diseminarse desde localizaciones primarias y formar metástasis distantes, es la principal causa relacionada con la mortalidad en pacientes con tumores sólidos. Es por ello que en los últimos años, se han centrado multitud de esfuerzos, en la identificación de rutas de señalización, y estructuras celulares que promueven este proceso migratorio. La motilidad celular, requiere que las células se adapten e interaccionen con la matriz extracelular que las rodea, que se recluten receptores transmembrana como integrinas y factores de crecimiento, además de adaptadores y moléculas de señalización como citoquinas (Guillaume Jacquemet et al., 2015). Es importante destacar el gen Smoc-2, miembro de la familia SPARC, que representa un grupo diverso de proteínas que modulan la interacción de las células con el medio. Los ocho miembros que componen esta familia son de naturaleza modular y son secretados al espacio extracelular. Se ha demostrado que SMOC-2, puede estimular la proliferación de células endoteliales y regula la migración al igual que la actividad angiogénica tanto *in vitro* como *in vivo*. (Rocnik Edward F., 2006; Amy D. Bradshaw, 2012).

Existen distintos tipos de migración, característica de diversos tipos celulares, así como la migración individual y la migración colectiva. Muchos estudios se han centrado en la migración en 2D, pero en la actualidad hay un gran interés por el conocimiento de la migración en el microambiente del tumor (3D). Sin embargo, la complejidad de su mecanismo y la falta de técnicas adecuadas, hacen que este sea aún un proceso desconocido (Xavier Trepatt et al., 2012).

Distintos tipos celulares presentan tipos de migración característicos, en el presente estudio, por su implicación con el trabajo aquí desarrollado, nos centraremos en la migración del fibroblasto. *In vivo*, de manera típica los

fibroblastos están presentes en el tejido conectivo, donde sintetizan colágeno, glicosaminoglicanos y otras importantes glicoproteínas de la matriz extracelular (ECM) como la fibronectina. Los fibroblastos cultivados en vidrio tienen una forma alargada o de huso y a menudo se caracterizan por presentar varias extensiones, presentan movimientos lentos y cambian de dirección a menudo (Albert et al. pp 965-1051, 5th Edition).

Los fibroblastos desempeñan un papel crítico en la cicatrización de heridas. Tanto *in vivo* como *in vitro*, los fibroblastos que migran en las heridas, adquieren señales que les permiten secretar proteínas de la matriz extracelular (ECM) y proliferar, presentando un gran lamelipodio y pocas fibras de estrés, al contrario que ocurre en fibroblastos en un cultivo estacionario (Martin P. 1997). Se sabe que muchos de los factores de crecimiento presentes en las heridas actúan como mitógenos o como factores quimioatrayentes para los fibroblastos; esto incluye por ejemplo, al factor de crecimiento epidérmico (EGF) y al factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) (Werner S. et al., 2003; Ware MF. Et al., 1998). La estimulación a través de factores de crecimiento, puede estimular la velocidad de la migración individual hasta 3 veces, al mismo tiempo que incrementan los cambios en la dirección de migración de la célula (Ware MF. Et al., 1998; Green KJ. Et al., 2010).

En matrices 3D la migración celular tiene tres factores importantes que la regulan: Las adhesiones célula-matriz, pequeñas GTPasas de la familia Rho y proteasas. En cultivos 2D, las integrinas son ante todo las responsables de las adhesiones celulares a la matriz (ECM), en forma de adhesiones focales (FAs), contactos focales, podosomas, etc. (Xavier Trepatt et al., 2012; Balzac F. et al., 2005; Cox D. et al., 2010).

Las adhesiones focales se encuentran normalmente al final de las fibras de estrés y pueden tener una vida media de minutos a horas. Sus componentes se pueden dividir en cuatro categorías: (1) componentes de la matriz (fibronectina, laminina, vitronectina y colágeno son las más importantes); (2) proteínas transmembrana, donde destacan las integrinas; (3) proteínas estructurales que estabilizan la adhesión focal y (4) proteínas de señalización (Zaidel-Bar R. et al., 2004; Harris TJ. et al., 2010). El número de proteínas encontradas en este tipo de estructura excede ahora las 160, por lo que sus interacciones son muy complejas. Las adhesiones focales son estructuras

dinámicas que sufren ciclos de ensamblaje y desensamblaje contribuyendo a la migración (Ezratty EJ. Et al., 2005; Ilic D. et al., 1998).

El ensamblaje de la adhesión focal tiene lugar a través de un estímulo, como un factor de crecimiento, que produce una activación de las integrinas que se unen a los componentes del ECM y reclutan proteínas de señalización (GTPasas y quinasas); este proceso activa rutas como la fosforilación de la quinasa de adhesión focal (FAK), activación de MAPK y formación de complejos proteicos (Xavier Trepatt et al., 2012; Zaidel-Bar R. et al., 2004). La activación de la quinasa de adhesión focal (FAK), puede ser disparada por señales del microambiente, tales como composición de la matriz, citoquinas, factores de crecimiento, integrinas y cambios en el PH (Florian J. Sulzmaier et al., 2014; Chen GZ et al., 2007; Guillou et al., 2008).

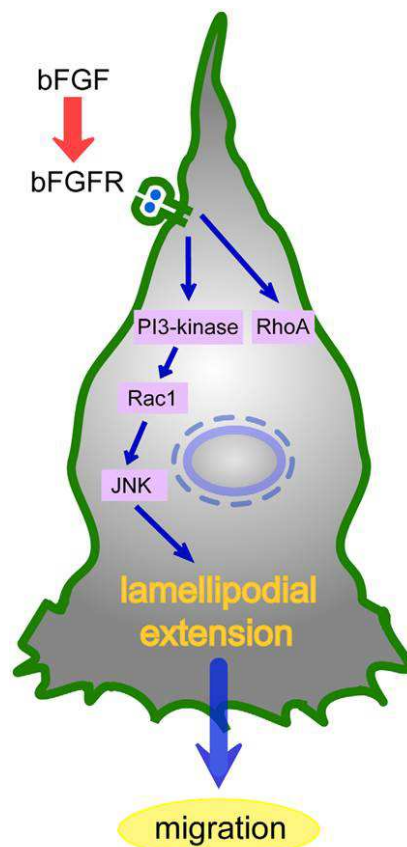


Figura 10. Ruta de transducción de señal estimulada por bFGF en la migración del fibroblasto. La activación del receptor bFGFR estimula la ruta PI3 quinasa, resultando finalmente en la extensión del lamelipodio (Kanazawa S et al., 2010).

8. Muerte celular por pérdida de anclaje

Las células normales sufren muerte celular y/o parada de crecimiento por pérdida de anclaje a la matriz extracelular (ECM) o por un contacto anómalo. Este constituye un mecanismo importante de defensa en organismos pluricelulares para prevenir la re-adhesión o despegue de células hacia otras matrices y que puedan crecer en sitio inapropiado. Las células del tumor que crecen y se desplazan fuera de su localización original han debido perder en primer lugar el contacto con su ECM innata y adaptarse a matrices no permisivas de tejidos extraños (Assoian RK. Et al., 1997; Chiarugi P. et al., 2008). Para sobrevivir a este proceso, las células tumorales adquieren resistencia a la muerte celular o a la inducción de parada de crecimiento in ausencia de una adhesión apropiada a la matriz (ECM) (Berrier AL. et al., 2007).

Anoikis es un tipo particular de apoptosis inducida por una inadecuada interacción de la célula al ECM y ha sido ampliamente caracterizada. Sin embargo, la pérdida de adhesión al ECM también puede inducir otros mecanismos de muerte celular, entre los que incluimos entosis y autofagia (Paoli P. et al., 2013; Ishikawa F. et al., 2015; Deschesnes RG. Et al., 2007; Fuchs BC. et al., 2008).

8.1 Anoikis y Apoptosis

En ausencia de adhesión a la matriz extracelular (ECM) o una adhesión inapropiada, las células sufren un tipo particular de apoptosis conocida como anoikis, un término griego que significa pérdida de hogar. De hecho, los receptores de integrina, como mediadores de la interacción célula-ECM, no solo proporcionan una unión física con el citoesqueleto, también transducen señales desde el ECM hasta la célula, críticas para procesos como migración, proliferación y supervivencia (Reddig P.J. et al., 2005; Paoli P. et al., 2013; Farrelly N. et al., 1999). Anoikis actúa como una importante defensa en el organismo, para prevenir pérdida de anclaje de células y readhesión de estas a nuevas matrices en lugares incorrectos. El fallo para ejecutar este programa de muerte, conlleva que las células adherentes puedan vivir en condiciones de suspensión o en sitios ectópicos con matrices que no le

corresponden. La desregulación del anoikis ha sido considerada como un signo característico del cáncer que contribuye a la metástasis (Chiarugi P. et al., 2008; Frisch S.M. et al., 2001; Frisch S.M. et al., 1999; Tadey M.L. et al., 2012).

La iniciación y ejecución de anoikis está mediada por diferentes rutas, las cuales convergen en la activación de caspasas y la estimulación de sus rutas moleculares, culminando en la activación de endonucleasas, fragmentación del DNA y muerte celular. La inducción del programa de anoikis ocurre a través de la interacción de dos rutas apoptóticas, llamadas de perturbación de la mitocondria (ruta intrínseca) o de señalización de receptores de muerte de la superficie celular (ruta extrínseca). Las proteínas de la familia Bcl-2 son los elementos clave de ambos procesos. La familia Bcl-2 puede dividirse en tres grupo: (1) proteínas antiapoptóticas, como Bcl-2, Bcl-XL y Mcl1; (2) proteínas pro-apoptóticas multidominio Bax, Bak y Bok y (3) proteínas pro-apoptóticas BH3, como Bid, Bad, Bim, Bmf Noxa Puma y Hrk (Reddig P.J. et al., 2005; Fukai F. et al., 1998; Grossmann J et al., 1998; 2002).

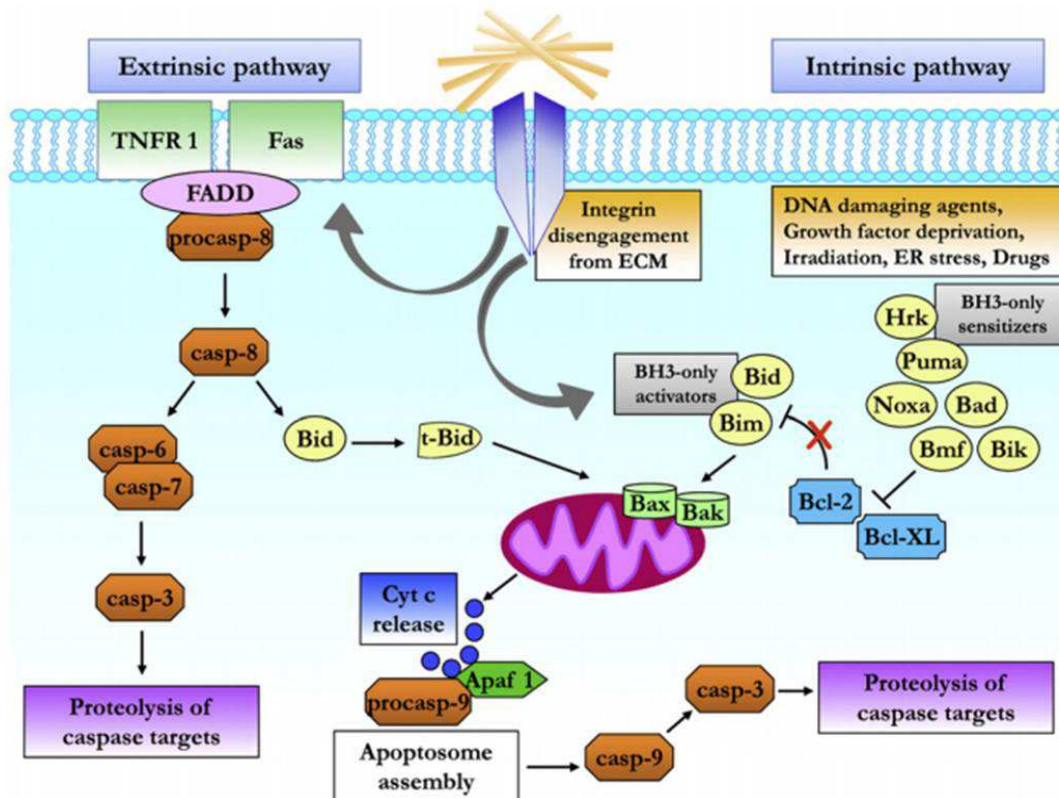


Figura 11. Rutas de apoptosis intrínseca y extrínseca. La falta de contacto al ECM o el contacto inapropiado, guía a una activación de anoikis a través de receptores de muerte (ruta extrínseca) y mitocondria (ruta intrínseca) (Paoli P. et al., 2013).

8.2 Autofagia

La autofagia es el mecanismo por el cual las células inducen el procesamiento lisosomal de su propia maquinaria con el fin de responder a estrés de nutrientes (Lock R. et al., 2008; Tsuchihara k. et al., 2009). Se cree que la autofagia puede proporcionar medio temporal para evitar la muerte celular como resultado de la inanición. Durante la autofagia, las células forman una vesícula de doble membrana doble, conocido como el autofagosoma, dentro del citoplasma que actúa empaquetando proteínas y orgánulos celulares. Las vesículas son entonces transportadas a los lisosomas y catabolizadas. Los productos degradados son transportados fuera del lisosoma para que la célula los pueda emplear para crear nuevas proteínas. Se ha demostrado, que la pérdida de integrinas es suficiente para disparar la autofagia (Fung C. et al., 2008). La autofagia se regula dentro de la célula por una familia de proteínas conocidas como proteínas relacionadas con la autofagia (ATG). Durante la separación al ECM, la pérdida de proteínas ATG resulta en un aumento de la apoptosis.

8.3 Entosis

Otro mecanismo de muerte celular altamente regulado que se induce por pérdida de anclaje al ECM es la entosis. La entosis es definida como un mecanismo por el que una célula viva invade a otra célula vecina, dando lugar a un estado en el cual la célula invasora se mantiene viva por la célula huésped (Overholtzer M. et a., 2007). El fenómeno se observó inicialmente en una variedad de distintos cánceres, donde su fenotipo mostraba una célula dentro de otra (Overholtzer M. et a., 2007; Overholtzer M. et a., 2008) postulando que la entosis podría ocurrir debido a la inanición de nutrientes. Sin embargo, el descubrimiento de que las células cancerosas cultivadas en medios ricos en suero podían sufrir también entosis, trasladó estos estudios en una dirección diferente. En la actualidad, se piensa que la entosis ocurre debido a fuerzas de compactación que experimentan las células, y pueden ser debidas en gran parte a la de señalización de la integrina y la pérdida de anclaje al ECM, ya que por ejemplo, al reintroducir Matrigel encontró que rescata el fenotipo entótico. Las células envueltos durante entosis no son fagocitadas y se ha observado que pueden ser funcional y metabólicamente activas. Estas células

internalizadas pueden ser liberadas para volver a entrar en ciclo celular una vez desaparezcan los estímulos de estrés, o bien se pueden matar cuando el estrés es prolongado. La actividad entótica está mediada por la actividad de Familia Rho GTPasas y ROCK (protein quinasa asociada a Rho) proteína, que actúa sobre el citoesqueleto celular (Overholtzer M. et al., 2007). Después de la internalización de una célula, las vacuolas entóticas son objeto de la degradación mediante la fusión con el lisosoma. Curiosamente, este fenómeno utiliza componentes de la maquinaria de autofagia (Florey O. et al., 2011).

8.4 Necroptosis

La Necrosis ha sido durante años considerada como un tipo de muerte pasiva en comparación con la altamente regulada y ordenada apoptosis. Sin embargo, evidencias recientes sugieren que la necrosis también puede ser un proceso altamente regulado, activado en una variedad de situaciones fisiológicas diferentes (incluyendo pérdida de anclaje al ECM). Esta "necrosis programada" se ha denominado necroptosis y fue descubierta inicialmente, por ser inducida por tumor el factor de necrosis alfa (TNF α) (Degterev A. et al., 2005). Además, la proteína de interacción receptor 1 (RIP1) se encontró que también estaba involucrada en la vía de señalización de la necroptosis (Degterev A. et al., 2008). RIP1 quinasa puede ser encontrado en el complejo de membrana 1 de señalización de muerte en presencia de TNF α (Micheau O. et al., 2003). RIP1 se normalmente se poliubiquitina y el resultado final es la activación de la vía IKK y la translocación de NF κ B al núcleo para que actúe como factor de transcripción. Sin embargo, cuando se RIP1 se deubiquitina por enzimas como CYLD, existe otra asociación que guía a la formación de un complejo 2, que parece ser crítico para la necroptosis cuando se inhibe la activación de la caspasa-8 (Wang L. et al., 2008; Buchheit C.L. et al., 2012). Curiosamente, necroptosis puede vincularse a la pérdida de adhesión del ECM y metabolismo a través de su regulación por ROS.

Tipo de Muerte Celular	Principales características bioquímicas	Dependencia de caspasas
Anoikis	-Bajada de EGFR -Inhibición señalización Erk1 -Falta de anclaje de b1-integrina -Sobreexpresión de BIM Activación de Caspasa-3 (-6 ,-7)	++
Autofagia	-Lipidación MAP1LC3 -Degradación SQSTM1	--
Apoptosis intrínseca dependiente de caspasas	- Permeabilización membrana exterior mitocondrial -Disipación del potencial transmembrana mitocondrial	++
Apoptosis intrínseca independiente de caspasas	-Lanzamiento de proteínas IMS -Inhibición de la cadena respiratoria	--
Entosis	-Activación de RHO -Activación de ROCK1	--
Apoptosis extrínseca por receptores de muerte	ruta mediada de -Señalización por receptores de muerte -Activación de caspasa-8 (-10) -Permeabilización membrana exterior mitocondrial -Activación de caspasa-3 (-6,-7)	++
Catástrofe mitótica	- Activación de caspasa-2 (en algunos casos) -Activación de TP53 o TP73 (en algunos casos) -Parada Mitótica	--
Necroptosis	-Señalización por receptores de muerte -Inhibición de caspasas -Activación de RIP1 y/o RIP3	--

Tabla 5. Clasificación funcional de procesos de muerte celular programada (Galluzzi L. et al., 2012).

9. Modelos animales para *pttg1*

Se han desarrollado varios modelos animales deficientes en PTTG1 para estudiar su papel en tumorigénesis y otros procesos fisiológicos. Con la finalidad de demostrar la importancia de este gen, Wang et al. desarrollaron ratones carentes del gen *pttg1* murino por recombinación homóloga (Wang et al. 2001). Detectaron que los ratones PTTG1^{-/-} eran viables y fértiles en contraste con los fenotipos observados en *securina* de levadura o de *Drosophila*, cuya falta es letal. Ya que *securina* está envuelta en inhibir la separación de las cromátidas hermanas, se esperaba que los ratones knockout no sobrevivieran. Sin embargo, el fenotipo no es fatal, sugiriendo la existencia de mecanismos adicionales compensatorios para la separación de las cromátidas hermanas en mamíferos (Wang et al. 2001). Además la existencia de respuestas fenotípicas específicas de tejidos en ratones PTTG1^{-/-} sugieren un papel diferencial de PTTG1 en distintos tejidos y una supresión del crecimiento específico del tipo celular, con particular incidencia en células endocrinas (Vlotides et al. 2007).

Los ratones carentes de PTTG1 presentan hipoplasia esplénica y testicular, hiperplasia tímica y trombocitopenia, sugiriendo la implicación de PTTG1 en espermatogénesis y formación de plaquetas (Wang et al. 2001). Además, Wang et al. observaron una reducción de la masa de los islotes pancreáticos y decrecimiento del número de células β en ratones knockout machos, resultando en la aparición de diabetes tipo I en su edad adulta (Wang et al. 2001). Los ratones hembra PTTG1^{-/-} muestran niveles normales de glucosa en plasma, sugiriendo que los estrógenos pueden proteger el mantenimiento del islote y la proliferación de células β (Wang et al. 2001).

Recientemente, el grupo de Kakar S. ha generado un modelo de ratón transgénico que expresa de manera constitutiva el gen *hpttg1*. Análisis inmunohistoquímicos revelaron sólo la presencia de tumores de ovario y trompa de Falopio además de carcinoma papilar, indicando que *pttg1* necesita actuar de modo cooperativo con otros genes para estimular un fenotipo más drástico (Fong MY., 2012; Kakar SS. And Kakar C, 2015).

OBJETIVOS

Objetivos:

1. Estudiar la capacidad moduladora que ejerce el gen *pttg1* sobre la expresión de genes relacionados con el microambiente del tumor, en células inmortalizadas de ratón NIH3T3.
2. Estudiar la capacidad transactivadora del gen *pttg1* en células tumorales humanas y establecer nexos con su posible implicación biológica en el desarrollo del tumor.
3. Estudiar el efecto en el desarrollo tumoral de la sobreexpresión e interferencia del gen *hpttg1* sobre el modelo animal de xenotransplante en mama con la línea celular de origen luminal MCF7.

MATERIALES Y MÉTODOS

MM.1 Material biológico.

1.1. Bacterias

(a) Cepas

Para la producción de DNA plasmídico se utilizaron las estirpes **DH5α** y **XL1-Blue** de *Escherichia coli*

Cepa	Genotipo	Referencia
DH5α	<i>F endA1 hsdR17 (mK⁺, rK⁻) supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 ΔlacU169 (φ 80 lacZΔM15)</i>	(Hanahan, 1983)
XL1-Blue	<i>F' [proAB⁺ lacI^q lacZΔM15 Tn10(tet^r)] endA1 hsdR17 supE44 recA1 gyrA46t hi relA1 lac⁻</i>	(Bullock et al., 1987)

Tabla 6. Cepas de *E. coli*.

(b) Medios de crecimiento

Las cepas de *E. coli* se cultivaron en medio LB en estufa a 37 °C. Para la selección de bacterias portadoras de plásmidos se suplementó en cada caso con el antibiótico de selección correspondiente. Las bacterias se crioconservaron añadiendo glicerol estéril a una concentración final del 15% a cultivos bacterianos y se guardaron a -80°C.

Medio Luria-Bertani (LB): 10 g/l bactotripton, 5 g/l extracto de levadura, 10 g/l NaCl. Para medio LB sólido, añadir 15 g/l de Bactoagar. Autoclavar y guardar a 4°C o a temperatura ambiente.

Antibióticos: Ampicilina (100 µg/ml), Kanamicina (50 µg/ml). Esterilizar por filtración usando filtros de 0,22 µm (Millipore).

1.2. Cultivos celulares

1.2.1 Líneas celulares estables

Línea celular	Características / Origen	Tipo celular	Medio de cultivo
NIH3T3	Fibroblatos de ratón immortalizados	Epitelial	DMEM+ 10%NCS
NIH3T3cat	Derivada de NIH3T3 mediante transfección estable con los plásmidos pOPI3CAT y pCMVLacI, posterior selección con geneticina e higromicina	Epitelial	DMEM+ 10%NCS
NIH3T3pttg B2 y B3	Derivadas de NIH3T3 mediante transfección estable con los plásmidos pOPI3-PTTG1 y pCMVLacI, posterior selección con geneticina e higromicina	Epitelial	DMEM+ 10%NCS

NIH3T3 clon2	Derivada de NIH3T3 transfectada con pTet-on y pTre2Hyg-PTTG1h, seleccionando mediante resistencia a antibióticos geneticina e higromicina.	Epitelial	DMEM+ 10%NCS
MCF10a	Línea inmortalizada de glandula mamaria, humana (cedida amablemente por el Dr. Mauricio Reginato, Drexel University, Filadelfia).	Epitelial	(*)Medio MCF10a
MCF7	Adenocarcinoma de mama humano	Epitelial	RPMI1640+ 10% FBS
MCF7 luc Clon2	Derivada de MCF7 mediante transfección estable con el plásmido pcDNA3.1 conteniendo el gen luciferasa bajo el promotor CMV y posterior selección con el antibiótico geneticina (G418).	Epitelial	RPMI1640+ 10% FBS
MDA-MB231 4175	Adenocarcinoma de mama, metastatiza en pulmón y nódulos linfáticos.Contienen el gen luciferasa bajo un promotor constitutivo. (cedida por el Dr. Joan Masagué Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, Nueva York)).	Epitelial	DMEM+ 10% FBS+ 1mM Piruvato+ 10mM Hepes
HCT116	Carcinoma colorectal humano	Epitelial	McCoy's 5A + 10% FBS
HEK A293T	Células embrionarias de riñón humano	Epitelial	D-MEM + 10% FBS

Tabla 7. Líneas celulares estables.

(*) Medio MCF10a DMEM F12 (1:1), suplementado con 5% de suero de caballo inactivado (HS), 10mg/ml de insulina (Sigma), 20ng/ml de factor de crecimiento epidérmico (EGF, Peprotech), 100ng/ml de toxina colérica (Sigma), 500ng/ml de hidrocortisona (Sigma) y con una mezcla de antibióticos (100µg/ml estreptomycin y 100 U/ml penicilina, ambos de Gibco).

1.2.2. Infección de líneas celulares

NIH3T3-virPTTG1 se generó mediante infección lentiviral a MOI=5 con lentivirus que contenían el cDNA PTTG1 bajo el promotor constitutivo SFFV y el gen GFP bajo el promotor constitutivo ubiquitín ligasa (UBIQ).

NIH3T3-virGFP se generó mediante infección lentiviral a MOI=5 con lentivirus que contenían el gen GFP bajo el promotor constitutivo UBIQ.

MCF7virGFP, MCF7virPTTG1-GFP y MCF7vir-iRNA-PTTG1-GFP se generaron mediante infección lentiviral a MOI=1 y MOI=5 con lentivirus conteniendo el cDNA PTTG1 bajo el promotor constitutivo SFFV y el gen GFP bajo el promotor ubiquitín ligase, el gen GFP bajo el promotor constitutivo UBIQ, y RNA de interferencia contra PTTG1 bajo el promotor U6.

MCF10a-virPTTG1-GFP, MCF10a-virGFP y MCF10a-vir-iRNA-PTTG1-GFP, se generaron mediante infección lentiviral a MOI=1 y MOI=5, con lentivirus conteniendo el cDNA PTTG1 bajo el promotor constitutivo SFFV y el gen GFP bajo el promotor ubiquitín ligasa, el gen GFP bajo el promotor constitutivo UBIQ y RNA de interferencia contra PTTG1 bajo el promotor U6.

HCT116virGFP y HCT116virPTTG1-GFP Se generaron mediante infección lentiviral de la línea HCT116 silvestre, a MOI=1.2. Los lentivirus contenían el cDNA Pttg1 bajo el promotor constitutivo SFFV y el gen GFP bajo el promotor ubiquitín ligasa y el gen GFP bajo el promotor constitutivo UBIQ

En todos los casos, el porcentaje de la población infectada por el lentivirus se determinó midiendo la señal de fluorescencia del gen marcador GFP mediante citometría de flujo en ambos casos.

1.2.3 Cultivo de líneas celulares

Las líneas celulares se cultivaron en sus correspondientes medios indicados en la tabla 7, suplementados con suero fetal bovino (FBS, *Fetal bovine serum*. PAA), suero fetal de ternero (NCS, new calf serum, PAA) o suero de caballo (HS, Horse serum, Gibco), al % indicado según el caso, además se añadió 2mM de L-Glutamina (Gibco) y una mezcla de dos antibióticos (100 µg/ml de Estreptomicina y 100 U/ml de Penicilina, Gibco). Las células se incubaron en atmósfera húmeda, a 37°C y con CO₂ al 5%.

Las células, se cultivaron en placas o frascos de cultivo para células adherentes, añadiendo en cada caso el volumen correspondiente. El proceso de subcultivo se realizó lavando con PBS (1x, Gibco) o PBS-EDTA (PBS1x+ 1mM EDTA) y añadiendo el volumen adecuado de una solución de tripsina 1x. Tras una pequeña incubación a 37°C (2-5 min), se neutralizó la reacción de tripsinización añadiendo medio de cultivo y realizando la dilución pertinente.

1.2.4 Congelación y descongelación de células

Las células en fase exponencial (60-80% de confluencia), se recogieron y se resuspendieron en medio de congelación a una concentración de 5×10^6 células/ml. Los viales se mantuvieron durante 16 horas a -80°C en un

contenedor de isopropanol (*Mr. Frosty*, Nalgene) y posteriormente se almacenaron en contenedores de nitrógeno líquido.

Las células se descongelaron en baño de agua a 37°C y se lavaron con 10 volúmenes de medio de cultivo. Se centrifugaron 5 minutos a 500 g y el precipitado de células se resuspendió en el medio de cultivo correspondiente.

Medio de congelación: 5% DMSO (Dimetil sulfóxido), 95% FBS. Guardar a -20°C.

1.3. Animales de experimentación

Para la realización de los ensayos *in vivo*, se emplearon ratonas atímicas Crl: UN-Foxn1^{nu} de entre 5 y 6 semanas de edad, suministradas por la compañía Charles River en condiciones SPF (libre de patógenos). Durante el proceso experimental se mantuvieron en condiciones de esterilidad en racks ventilados dentro del animalario ubicado en las instalaciones del CABIMER.

1.4. Otros reactivos

a) Drogas

Brefeldina A (BFA) de la casa comercial Sigma-Aldrich (San Louis, MO, USA), se utilizó a una concentración de 5µg/ml durante 1h para bloquear el tráfico de vesículas, evitando la secreción de citoquinas al exterior celular, y así permitir su detección mediante ensayos de Western Blot.

IPTG (isopropil-β-D-tio-galactósido) se utilizó como inductor artificial del operón *lac*, ya que es capaz de unirse al represor LacI, pero no es un sustrato de la β-galactosidasa. Se obtuvo de la casa comercial Sigma-Aldrich. Las inducciones se llevaron a cabo a una concentración de 4mM durante 18h.

Doxiciclina de la casa comercial Sigma-Aldrich se utilizó como análogo de la tetraciclina en el sistema de inducción tet-on. Las inducciones se llevaron a cabo a una concentración de 4µg/ml durante 24h.

b) Antibióticos de selección

Para seleccionar las células establemente transfectadas, se emplearon los antibióticos geneticina (G418) de la casa comercial Gibco a una

concentración de 400µg/ml e Higromicina B de la casa comercial Invivogen a una concentración de 200µg/ml.

c) Anestésicos

El tipo de anestésico empleado para el procedimiento quirúrgico fue una mezcla de 1ml de Rompúm (Xilacina) + 4ml de Imangene 500 (Ketamina)+ 5ml de agua destilada. Dicha mezcla se conservó a 4°C en oscuridad, aplicando una dosis de 100µl/20 g de peso mediante inyección intraperitoneal.

Para los ensayos de imagen *in vivo*, se empleó el anestésico Isoflurano 1-3% mezclado con CO₂ mediante un equipo de anestesia.

MM.2 Manipulación del DNA

2.1 Plásmidos

Plásmido	Características	Referencia / Procedencia	Uso
pCMV LacI	Contiene el gen LacI bajo el promotor CMV y produce la proteína represora LacI.	Stratagen	Sistema inducible LacI
pOI3 CAT	Vector control del sistema LacI que contiene el gen cloranfenicol acetil transferasa (<i>cat</i>) bajo el promotor RSV	Stratagen	Sistema inducible LacI
pOI3/PTTG1	Derivado de pOI3 CAT, subclonando el gen completo de PTTG1 bajo el promotor RSV	Dr. JA Pintor-Toro, Cabimer, Sevilla (España)	Sistema inducible LacI
pTet-On	Contiene el gen rTetR- VP16 (<i>rtTA</i>) bajo el promotor CMV y en presencia de doxiciclina activa la transcripción.	Clontech	Sistema inducible Tet-On
pTRE2hyg-PTTG1	Derivado de pTRE2hyg, subclonando el DNA completo de PTTG1 bajo el promotor CMV y el elemento de respuesta a Tet, TRE.	Dr. JA Pintor-Toro, Cabimer, Sevilla (España)	Sistema inducible Tet-On

pcDNA::Luc	Derivado de pcDNA3, clonando el gen luciferasa (<i>Luc</i>) bajo el promotor CMV	Dr. JA Pintor-Toro, Cabimer, Sevilla (España)	Ensayos <i>in vivo</i> con ratones
pSIN-DUAL-GFP1-GFP2	Contiene 2 copias del gen GFP bajo los promotores SFFV y UBIQ.	Mary K. Collins, Windeyer Institute, Londres (Reino Unido)	Producción de lentivirus
pSIN-DUAL-GFP2	Derivado de pSIN-DUAL-GFP1-GFP2. Se eliminó la copia de GFP bajo SFFV mediante restricción enzimática.	Dr. JA Pintor-Toro, Cabimer, Sevilla (España)	Producción de lentivirus
pSIN-DUAL-PTTG1-GFP2	Derivado de pSIN-DUAL-GFP1-GFP2. Se sustituyó la copia de GFP bajo SFFV por el cDNA de PTTG1.	Dr. JA Pintor-Toro, Cabimer, Sevilla (España)	Producción de lentivirus
pSIN-DUAL-iRNA PTTG1-GFP2	Derivado de pSIN-DUAL-GFP1-GFP2. Se sustituyó la copia de GFP bajo SFFV por el cDNA de iRNA-PTTG1.	Dr. JA Pintor-Toro, Cabimer, Sevilla (España)	Producción de lentivirus
pCMVDR 8.91	Plásmido de empaquetamiento de partículas víricas	Dr. Francisco Martín (ILPB, CSIC, Granada)	Producción de lentivirus
pMDG (VSV-G)	Plásmido de la envuelta lentiviral	Dr. Francisco Martín (ILPB, CSIC, Granada)	Producción de lentivirus
pCMV-RL	Porta la ORF de renilla	Promega	Expresión en eucariotas (ensayos de transactivación)
pluc 2.8/2	Derivado de pFlashI contiene el gen de la luciferasa unido a distintos fragmentos del promotor del gen MCP1	Dr. Bruno Luckow (Univ. Ludwig-Maximilians, Munich)	Expresión en eucariotas (ensayos de transactivación)
pluc 2.8/5	Derivado de pFlashI contiene el gen de la luciferasa unido a distintos fragmentos del promotor del gen MCP1	Dr. Bruno Luckow (Univ. Ludwig-Maximilians, Munich)	Expresión en eucariotas (ensayos de transactivación)
pluc 0.5/5	Derivado de pFlashI contiene el gen de la luciferasa unido a distintos fragmentos del promotor del gen MCP1	Dr. Bruno Luckow (Univ. Ludwig-Maximilians, Munich)	Expresión en eucariotas (ensayos de transactivación)

		Munich)
--	--	---------

Tabla 8. Relación de plásmidos utilizados.

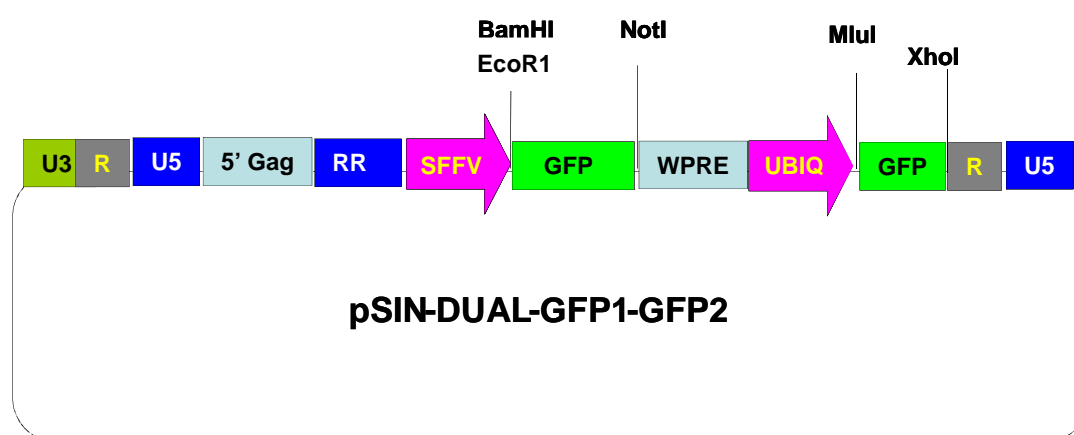


Figura 12. Estructura del vector pSIN-DUAL-GFP1-GFP2.

2.2 Cuantificación del DNA

La concentración de DNA se estimó midiendo la absorbancia a 260 nm en el espectrofotómetro NanoDrop® (*ND-1000 Spectrophotometer*). La riqueza de DNA con respecto a proteína se determinó teniendo en cuenta la relación absorbancia 260/ absorbancia 280.

2.3 Purificación de plásmido desde bacteria

Para aislar el DNA plasmídico se emplearon kit específicos y se siguieron las indicaciones de fabricante (Qiagen). La mayor parte de estas purificaciones se emplearon posteriormente en la transfección de células eucariotas.

2.4 Digestión de DNA con enzimas de restricción

Para la digestión del DNA se emplearon una batería de endonucleasas de restricción (New England Biolabs Takara; Amersham) con el tampón correspondiente para cada enzima. Las reacciones se hicieron de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

2.5 Electroforesis de DNA

Los fragmentos de DNA se separaron en geles de agarosa, preparados en tampón TAE 1x con 0.5 µg/ml de bromuro de etidio (EtBr, *Ethidium bromide*). Este mismo tampón (TAE 1x) se utilizó como electrolito. A las muestras se les añadió tampón de carga hasta una concentración final 1x. La concentración de agarosa utilizada en la preparación de geles osciló dependiendo del tamaño de los fragmentos a resolver (entre 0,5-2%). Para determinar el tamaño de los fragmentos se empleó un marcador comercial (*2Log DNA Ladder*, New England Biolabs).

Tampón TAE 1x: 40 mM Tris-acetato pH 8, 2 mM EDTA, 5 mM acetato sódico.

Tampón de carga de DNA 6x: 40% (p/v) sacarosa, 0,25% azul de Bromofenol, 6 mM EDTA pH 8.

Solución de EtBr: 10 mg/ml en H₂O (Sigma).

2.6 Purificación de fragmentos de DNA de geles de agarosa

Para la extracción de DNA de la agarosa se usó el Kit *Favorprep GEL/PCR Purification* (Favorgen) siguiendo las indicaciones del fabricante.

2.7 Transformación

Las bacterias competentes se transformaron por choque térmico. Se mezclaron 100 µl de bacterias (*Escherichia coli* cepa DH5α) con el DNA a transformar. La mezcla se incubó primero 15 minutos en hielo y luego 45 segundos a 42°C. Seguidamente se añadió 1 ml de LB y se incubó a 37°C durante 90 minutos. Transcurrido este tiempo las bacterias se sembraron en medio LB sólido suplementado con el antibiótico adecuado para seleccionar aquellas que hubieran incorporado el plásmido de interés

2.8 Análisis de los transformantes

La identificación de las bacterias transformadas para una determinada construcción se llevó a cabo mediante PCR. Para ello se picaron varias colonias transformadas con palillos estériles e inocularon en medio, (para conservar las colonias elegidas) y en tubos de PCR con un volumen de 50 µl de mezcla de reacción. Los productos de PCR se visualizaron en geles de

agarosa. Una vez identificadas las colonias transformadas, se procedió a confirmar mediante enzimas de restricción que los fragmentos obtenidos poseían el tamaño esperado.

2.9 PCR semicuantitativa

Para la PCR semicuantitativa usamos como molde cDNA obtenido en reacciones de retrotranscripción. Se utilizaron 1-2 μ l (~ 300 ng) del cDNA obtenido, 0,25 μ M de cada cebador, 2 mM dNTPs (dATP + dCTP + dGTP + dTTP, Sigma), 5 μ l de tampón Taq 10x y 1 U de *Taq* DNA polimerasa. Como cebadores se utilizaron oligonucleótidos específicos para el gen de estudio. Para normalizar la cantidad y calidad del cDNA obtenido de cada muestra, se realizaron amplificaciones mediante PCR con este cDNA y cebadores para genes de expresión constitutiva como β -actina o HPRT. Posteriormente, se separaron las bandas obtenidas en un gel de agarosa al porcentaje adecuado según el tamaño de banda esperado (Ausubel FM. et al., 1989).

De modo general, se usaron las siguientes condiciones de reacción: 5 minutos a 95 °C para desnaturalizar el DNA y 30 ó 35 ciclos con la siguiente secuencia: 30 segundos a 95 °C, 30 segundos a una temperatura 5°C por debajo de la T_m (*Melting temperature*) de los oligonucleótidos usados, 1-3 minutos (1 minuto por cada Kb del fragmento a amplificar) a 72 °C para la síntesis de DNA, y finalmente 5 minutos a 72°C.

Tampón Taq 1x : KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM pH 8.3, MgCl ₂ 1,5 mM y gelatina 0,01% (p/v).

2.10 PCR cuantitativa (PCR tiempo real)

El equipo de PCR en tiempo real empleado fue Applied biosystems 7500 y las condiciones de amplificación, para la mayoría de los genes fueron las condiciones universales establecidas por el fabricante: 1 ciclo de 10min a 95°C y 40 ciclos de 15seg a 95°C y 1min a 60°C, dichas condiciones son válidas para todas sus sondas Taqman. En el caso de usar SYBR Green, tuvimos que determinar la eficiencia de cada pareja de primers. para estas condiciones. Las muestras se realizaron por triplicado en una placa de PCR de 96 pocillos con sus controles pertinentes y empleando como endógeno ("housekeeping"). el gen *hprt-1* humano/ ratón ((*Hypoxanthine-guanine*

phosphoribosyltransferase), que nos permitía normalizar la cantidad y calidad de cDNA procedente de distintas muestras.

Los resultados de PCR en tiempo real se analizaron mediante el programa *Real-Time PCR System* (Applied Biosystems). Obteniendo los resultados en forma de “Ct”. La cuantificación relativa utiliza el valor de estos “Ct” en el método “ $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ”.

Método del “ $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ” :

ΔCt = Ct gen de estudio – Ct gen de referencia

$\Delta\Delta Ct$ = ΔCt muestra - ΔCt control

Veces de cambio en la expresión del gen de estudio = $2^{-(\Delta Ct \text{ muestra} - \Delta Ct \text{ control})}$

Otro método de cuantificación consiste en determinar el número de copias de mRNA de un gen determinado por microgramo de cDNA y para ello se realizó una recta patrón utilizando, como molde en la reacción de amplificación un número conocido de copias (30, 300, 3.000, 30.000 y 300.000) de un plásmido que contenía la región codificante del gen de estudio (pEF-Flag-Pttg1). La recta se obtuvo representando el logaritmo del número de copias frente al valor de Ct obtenido en cada caso tras la reacción de PCR. Finalmente, extrapolando en dicha recta el valor de Ct obtenido para un gen determinado en una muestra, pudimos calcular el número de copias de mRNA de dicho gen por microgramo de cDNA en cada muestra. Este dato se normalizó con respecto al obtenido para Hprt-1 en cada muestra, para evitar errores debidos a variaciones en la cantidad y calidad del cDNA.

2.11 Reactivos PCR tiempo real

a) Sondas Taqman

Las sondas taqman para PTTG1 y HPRTh se diseñaron y fueron sintetizadas por la casa comercial Operon.

Hprt h primer f	ggACTAATTATggACAggACTg
Hprt h primer r	TCCAgCAggTCAGCAAAgAA
Hprt h sonda	TgTAgCCCTCTgTgCTCAAg-BHQ1a-6FAM

Pttg1 primer f	AggCACCCgTgTggTTgCT
Pttg1 primer r	TAAggCTggTggggCATC
Pttg1 sonda	AACTTgAgATCTCCCATCTAAggC-BHQ1a-6FAM

Tabla 9. Sondas usadas para PCR cuantitativa.

Para detectar los niveles de RNAm se emplearon las siguientes sondas Taqman: PTTG1r (#Mm00479224_m1), HPRT r (#Mm 01545399_m1), CCL2r (#Mm00441242_m1), CCL2h (Hs00234140_m1), SDF1 α r (#Mm00445552_m1) y SDF1 α h (Hs00171022_m1).

b) Cebadores

En las reacciones llevadas a cabo con reactivo SYBR Green, se utilizaron las siguientes parejas de cebadores descritas en la bibliografía (J.E. Holt, *Developmental Biology*, 2006 y M. Mestdagt, *Int. J. Cancer*, 2006).

Sdf1 α f	5'-CGCTCTGCATCAGTGACGGTA-3'
Sdf1 α r	5'-GTTCTTCAGCCGTGCAACAATC-3'
MCP1 f	5'-TAGCAGCCACCTTCATTCCCCAAG-3'
MCP1 r	5'-AATGGTCTTGAAGATCACAGCTTC-3'
Hprt f	5'-GGACTAATTATGGACAGGACTG-3'
Hprt r	5'-TCCAGCAGGTCAGCAAAGAA-3'

Tabla 10. Oligonucleótidos usados para PCR semicuantitativa.

c) SYBR y master mix taqman

La master mix que empleada para las reacciones con sondas taqman fue la Taqman Universal Master Mix (#4304437) y para las reacciones con cebadores se empleó SYBR Green PCR master mix (4309155) que se adquirieron a la casa comercial Applied Biosystems.

MM.3 Análisis transcripcional

3.1 Extracción de RNA total

Para las extracciones de RNA total, se sembraron las células en monocapa y se utilizó el reactivo Trizol® (Life technologies, Cat.No.15596). Se siguieron las indicaciones de la casa comercial, añadiendo 1ml de trizol® para cada placa de 10cm². Una vez extraído, se comprobó la ausencia de trazas e integridad del DNA genómico mediante electroforesis en gel de Agarosa al 1%.

Solución de carga de RNA 10x: 50% glicero, 1 mM EDTA pH 8, 0.25% azul de bromofenol

3.2 Cuantificación de RNA

La cuantificación de RNA se estimó midiendo la absorbancia a 260nm en un Espectrofotómetro NanoDrop® (ND-1000 Spectrophotometer) y se comprobó que el ratio DO260/280 se encontrara entre los valores 1,8 y 2. Las muestras se conservaron a -80°C.

3.3 Tratamiento con DNAsa

Si en alguna muestra de RNA total extraído se detectaba presencia de trazas de DNA genómico, se realizaba un tratamiento con DNAsa1 (RNAqueous-4PCR kit Protocol, Ambion) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Una vez tratada la muestra, se comprobaba la ausencia de contaminación.

3.4 Retrotranscripción

Para obtener moléculas de cDNA a partir de nuestros RNAm, realizamos reacciones de retrotranscripción. Esta reacción se llevó a cabo partiendo de 1µg de RNA total del que obtendríamos aproximadamente 1µg de

cDNA, utilizando la enzima SuperScript[™] III transcriptasa reversa (Invitrogen, 18080-093). A cada muestra, se le añadió 0,5µl de Oligo (dT) (100µM), 1µg de RNA total, 1µl de dNTPs (10mM) y H₂O destilada estéril hasta completar 14µl. La mezcla se incubó 5min a 65°C y a continuación 1min en hielo. Tras este paso, se le añadió a cada muestra 4µl de Buffer First-Strand 5x, 1µl de DTT 0,1M y 1µl de RNAsa SuperScript III (a las controles negativos, en lugar de añadirle 1µl de la enzima RNAsa SuperScript III, se le añadió 1µl de H₂O). Se mezcló pipeteando y se incubó 5min a 25°C (sólo en el caso de que se utilizaran primers aleatorios), 60min a 50°C y finalmente 15min a 70°C para inactivar la enzima y parar la reacción. Las muestras se almacenaron a -20°C.

3.5 Arrays de expresión génica

Para el estudio de perfiles de expresión génica se realizaron distintos tipos de arrays en distintas plataformas. Los arrays de NIH3T3 fueron de *Agilent* y se realizaron en el servicio de genómica del CNIO, los arrays de MCF7 y MCF10a (datos no mostrados) fueron de *Affymetrix* y se realizaron en el servicio de genómica del Cabimer. Las muestras de RNA se obtuvieron por triplicado para cada una de las condiciones utilizadas, partiendo de placas de células sembradas en monocapa que poseían una confluencia similar. Las extracciones de RNA total se realizaron como se describe previamente en el apartado 3.1 y se seleccionaron aquellas muestras de mejor calidad, en las que el ratio DO_{260/280} estaba comprendido entre 1,8 y 2. Según las indicaciones del servicio de Genómica, las muestras se pasaron a través de columnas (RNeasy MiniKit Qiagen #74104) para eliminar posibles restos de fenol, siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras fueron enviadas y procesadas por el servicio de Genómica del CNIO (para NIH3T3) y del Cabimer (para MCF7), donde de nuevo se cuantificaron y comprobaron su integridad mediante el *Bioanalyzer 2100 (Agilent)*, obteniendo un ring cercano a 10. Para aquellos cultivos celulares infectados con lentivirus, las muestras de RNA fueron recogidas y procesadas 7 días post-infección.

El análisis bioestadístico de los datos determinó si las diferencias entre los dos grupos eran o no significativas. Se consideraron aquellos genes cuya expresión varió 1,5 veces o más y con un grado de significación $p < 0,05$.

3.6 Enriquecimiento de genes

Muchas de las herramientas de análisis de enriquecimiento de genes están realizadas usando únicamente como fuente la ontología génica. *Enrichr* proporciona varios tipos de visualización que resume funciones colectivas de una lista de genes y está dividida en 6 categorías: transcripción, rutas, ontología, enfermedades/drogas, tipos celulares y varios.

Para el análisis de nuestras listas de genes, seleccionamos aquellos con un $p < 0,05$ y utilizamos la herramienta *Enrichr*. Además comprobamos los resultados empleando el software *DAVID 6.7*, y *GORilla*, para enriquecimiento en ontología génica.

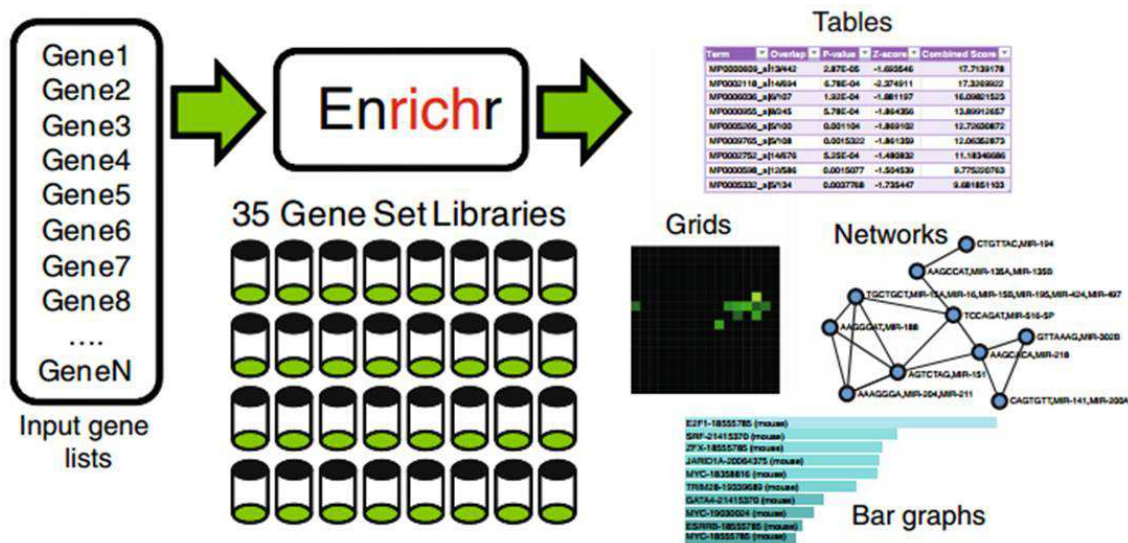


Figura 13. *Enrichr* recibe listas de genes humanos o de ratón como entrada. Utiliza 35 bibliotecas de set de genes para calcular enriquecimiento. Los resultados de enriquecimiento se muestran interactivamente como gráficos de barras, tablas, cuadrículas de acuerdo con los términos enriquecidos destacados y redes (Chen E. Y. et al., 2013).

3.7 Array de PCR en tiempo real

Para la realización de esta técnica, se adquirieron arrays de PCR en tiempo real de citoquinas y receptores de citoquinas de la casa comercial

Superarray (APMM-022A). Cada placa contenía cebadores para 84 genes de citoquinas y receptores de citoquinas, 5 parejas de cebadores para genes control (*housekeeping*), 1 pareja de cebadores para determinar la presencia de DNA genómico, 3 parejas de cebadores como controles de retrotranscripción y 3 parejas de cebadores como controles positivos. El proceso de retrotranscripción se llevó a cabo realizando una primera mezcla de 1µg de RNA con 1µl de primers y controles externos proporcionados por la casa comercial, calentando la mezcla 3min a 70°C. En un siguiente paso, a cada 10µl de la primera mezcla, se le añadieron 10µl de una segunda mezcla que contenía la enzima, el buffer, inhibidores de RNasa y H₂O. Se incubó a 37°C durante 60min y a 95°C 5min. A cada 20µl de mezcla, se le añadió 91µl de H₂O bidestilada y se almacenó a -20°C hasta la realización de la PCR en tiempo real.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Agtr1	Bdnf	Blr1	Bmp10	Bmp15	Bmp6	Ccbp2	Ccl1	Ccl11	Ccl12	Ccl17	Ccl19
B	Ccl2	Ccl20	Ccl4	Ccl5	Ccl6	Ccl7	Ccl8	Ccl9	Ccr1	Ccr11	Ccr2	Ccr3
C	Ccr4	Ccr5	Ccr6	Ccr7	Ccr8	Ccr9	Ccr11	Ccr12	Cklfs2a	Cklfs3	Cklfs4	Cklfs5
D	Cklfs6	Cmklr1	Cmkr1	Csf1	Csf2	Cx3cl1	Cx3cr1	Cxcl1	Cxcl10	Cxcl11	Cxcl12	Cxcl13
E	Cxcl15	Cxcl2	Cxcl4	Cxcl5	Cxcl7	Cxcl9	Cxcr3	Cxcr4	Cxcr6	Egfr1	Gdf5	Gpr2
F	Gpr81	Hif1a	Il13	Il16	Il18	Il1a	Il4	Il8ra	Il8rb	Inha	Inhbb	Lif
G	Ltb4r2	Mmp2	Myd88	Nfkb1	Rgs3	Slit2	Tlr4	Tnf	Tnfrsf1a	Tnfrsf14	Trem1	Xcl1
H	Gusb	Hprt1	Hspcb	Gapdh	Actb	MGDC	RTC	RTC	RTC	PPC	PPC	PPC

Figura 14. Plantilla de genes de quimioquinas y receptores de quimioquinas analizadas por PCR tiempo real.

En el momento de realizar la PCR tiempo real, a la mezcla de retrotranscripción, se le añadió 2x SuperArray SYBR Green PCR master mix y H₂O. Esta mezcla se repartió cuidadosamente por toda la placa y se desarrolló la técnica mediante el uso de un equipo *Applied Biosystems 7500*, empleando el siguiente programa: 1ciclo de 10min a 95°C y 40 ciclos de 15seg a 95°C y 1min a 60°C. Una vez finalizado el programa, las muestras se sometieron a curvas de disociación para confirmar la especificidad de nuestros cebadores (*curvas de Melt*). El análisis de los datos se realizó empleando el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ descrito anteriormente.

MM.4 Análisis traduccional

4.1 Extracción de proteínas

Las células de cultivos subconfluentes se despegaron y recogieron en tubos eppendorfs previo lavado con PBS 1X. Dependiendo del *pellet* celular, se añadieron de 2 a 3 volúmenes de buffer de extracción RIPA, suplementado con PMSF e inhibidores de proteasas, con EDTA en frío. La mezcla se incubó 20min a 4° y seguidamente 3 min a 37°C a continuación se centrifugó a 20.000g 15min a 4°C. Los sobrenadantes que corresponde a la fracción soluble se almacenaron en eppendorf limpios a -80°C.

Tampón RIPA: 0,5% deoxicolato sódico, 0,1 % de SDS, 1% NP40, 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl. Completar con 1 mM PMSF e inhibidores de proteasas con EDTA 1x.

Inhibidores de proteasas 50x: disolver una tableta de cóctel de inhibidores de proteasas con/sin EDTA (Roche) en 2 ml de H₂O bidestilada. Conservar a -20°C en alícuotas de 500 µl.

PMSF 100x : 100 mM de PMSF (Sigma) en etanol.

4.2 Cuantificación de proteínas por el método de Bradford

La concentración de proteína de los extractos obtenidos se midió empleando el método Bradford (1976), usando el reactivo *Bio-rad Protein Assay* (*Bio-rad*) y una recta patrón de seroalbúmina bovina, BSA, midiendo la absorbancia a 595nm. La concentración de proteínas se calculó extrapolando las densidades ópticas de las muestras en la recta patrón obtenida con las concentraciones conocidas de BSA.

Solución de Bradford: Se diluye el reactivo de Bradford (Bio-Rad) 1/5 en H₂O bidestilada.

Stock de BSA 10 mg/ml : disolver 100 mg de BSA (Sigma) en 10 ml de H₂O. Conservar a -20°C en alícuotas de 100µl.

4.3 Electroforesis de proteínas en geles de SDS-poliacrilamida

La inmunodetección de proteínas usando la técnica de western blot, se realizó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS en condiciones

desnaturalizantes según el protocolo descrito por Laemmli (Laemmli, 1970), haciendo uso del sistema Mini-Protean III Electroforesis Cell (Bio-rad, Richmon, California, E.E.U.U.)

En función del peso molecular de las proteínas se utilizaron geles al 10%, 12% o 15% de acrilamida. Las muestras de proteínas se desnaturalizaron en un volumen de tampón Laemli 2X, incubado a 95°C durante 5min. El patrón de pesos moleculares que se empleó fue el *Broad Range* (Bio-rad). La migración se realizó a 200V durante 1h, utilizando como electrolito el tampón Tris-Glicina 1x.

Reactivos	Base 10% (5ml)	Base 12% (5ml)	Base 15% (5ml)	Stacking (2ml)
H ₂ O	1.9ml	1.6ml	1.1ml	1.4ml
Archilamida 30%	1.7ml	2.0ml	2.5ml	0.33ml
1.5MTris(Ph 8.8)	1.3ml	1.3ml	1.3ml	---
1.0MTris(Ph 6.8)	---	---	---	0.25ml
10% SDS	0.05ml	0.05ml	0.05ml	0.02ml
10% APS	0.05ml	0.05ml	0.05ml	0.02ml
TEMED	0.002ml	0.002ml	0.002ml	0.002ml

Tabla 11. Reactivos para la preparación de geles de poliacrilamida-SDS.

Tampón Tris-glicina 10x: 250 mM TrisH-Cl, 1,94 M glicina. Para 1 l de tampón 1x se diluyen 100 ml del stock 10x en 890 ml de H₂O bidestilada y se añaden 10 ml de 10% SDS (*Sodium dodecyl sulfate*). Conservar a temperatura ambiente.

Laemmli 1x: 10% glicerol, 2% SDS, 62,5 mM Tris-HCl pH 6.8, 25 µg/ml azul de bromofenol, 5% β-mecaptoetanol. Preparar stock a 5x y guardar a -20°C.

4.4 Detección de proteínas con azul Coomassie

Una vez concluida la electroforesis, en los casos necesarios los geles se incubaron durante 1h en una solución de tinción a temperatura ambiente en agitación. Posteriormente se destiñeron en solución de lavado hasta que se eliminó el exceso de colorante y las bandas se detectaron con nitidez. Para conservar los geles a largo plazo se procedió a su secado usando un secador de geles de la casa comercial Bio-Rad modelo 583.

Azul de Coomassie: 50% metanol (v/v), 10% ácido acético (v/v), 40% agua destilada y 0,25% azul de Coomassie (Coomassie brilliant blue R-250, Sigma). Disolver el azul de Coomassie en etanol y luego añadir el resto. Filtrar.

Solución de lavado: 40% metanol, 10% ácido acético y 50% agua destilada.

4.5 Detección de proteínas con rojo Ponceau

Una vez transferidas a un filtro de nitrocelulosa (apartado 4.4) las proteínas se visualizaron tiñendo el filtro 5min a RT en agitación suave con la solución rojo Ponceau S y destiñéndolo con agua bidestilada.

Solución de rojo Ponceau 1x: 0,25% de rojo Ponceau S (Sigma) y 5% de ácido acético.

4.6 Análisis de proteínas por *western blot*

Para su realización, las proteínas resueltas en la electroforesis del apartado 4.2 se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa a través de distintos métodos.

a. Transferencia de proteínas a membrana de nitrocelulosa.

a.1 Transferencia semiseca.

Las proteínas presentes en los geles de acrilamida, se transfirieron mediante un equipo de transferencia semiseca (*Trans-Blot SD Semy-Dry Transfer Cell, Bio-rad*) a una membrana de nitrocelulosa *Hybond (Amersham)*, siguiendo las indicaciones del fabricante. Se aplicó un voltaje constante de 16V durante 45min a geles de 6x8 cm.

Tampón de transferencia en semi-seco 10x: 480 mM Tris-base, 390 mM Glicina. Para 200 ml de tampón de transferencia 1x, se usan 20 ml del stock 10x, al que se le añaden 40 ml de metanol 100% y 750 µl de SDS 10% y se completa el volumen con H₂O bidestilada.

a.2 Transferencia Húmeda.

Para transferir las proteínas de menor o mayor peso molecular se empleó la transferencia húmeda mediante un equipo de electrotransferencia (modelo Mini *Trans-Blot, Bio-Rad*), siguiendo las indicaciones del fabricante.

Se aplicó una intensidad constante de 250mA durante 2h a geles de 6x8cm, sin necesidad de realizar el proceso en cámara fría. Las membranas utilizadas fueron de nitrocelulosa *Hybond* (Amersham) y buffer de transferencia con carbonatos Dunn.

Tampón de transferencia en húmedo 10x: 8.4 g/l CO₃HNa, 3.2 g/l CO₃Na₂. Para 1 l de tampón de transferencia 1x se diluyen 100 ml del stock 10x en 750 ml de H₂O bidestilada y se añaden 150 ml de metanol 100% y 1 ml de SDS 10%.

Una vez transferidas las proteínas, los filtros se tiñeron con la solución de rojo Ponceau S (apartado 4.5) y posteriormente se destiñeron con agua bidestilada para continuar el proceso.

b. Inmunodetección de proteínas

Una vez transferidas las proteínas se procedió al bloqueo de las membranas de nitrocelulosa incubándolas durante 1h a RT con un tampón de bloqueo (5% de leche en polvo en TBS-Tween, TBS-T) en agitación. Posteriormente se incubó con los anticuerpos primarios específicos durante toda noche a 4°C en el mismo buffer de bloqueo y en agitación suave. Una vez incubada con los distintos anticuerpos primarios

Al día siguiente, las membranas se lavaron 3 veces con buffer de lavado TBS-T 1X en agitación durante 10min cada lavado, y a continuación se incubaron con el anticuerpo secundario en buffer de bloqueo a RT durante 1h en agitación suave. Se utilizaron anticuerpos secundarios conjugados a peroxidasa (*ECL Anti-mouse IgG* y *ECL Anti-rabbit IgG*, Amersham Biosciences) en tampón de bloqueo, a la dilución recomendada por el fabricante o establecida previamente. Tras la incubación con el anticuerpo secundario, la membrana se lavó durante 30 minutos, 3 lavados de 10 minutos cada uno, con tampón TBS-T a temperatura ambiente. Para la detección del anticuerpo secundario se utilizó el kit *ECL™ Western Blotting Analysis System* (Amersham), siguiendo las instrucciones del fabricante. El filtro o membrana se expuso a películas radiográficas Medical X-Ray (*Konica Minolta*) a diferentes

tiempos y se revelaron en un equipo Hyper processor (*Amersham Biocience*). En determinados casos, se realizó cuantificación de bandas por densitometría, normalizando con la expresión de β -actina o de GAPDH. Las medidas de densitometría se realizaron en un densitómetro ImageScanner y procesando las imágenes mediante el software LabScan e ImageQuant TL 7.0 (*GE Healthcare*). En algunos casos, se emplearon anticuerpos secundarios marcados con Cy3 y Cy5. El proceso de detección de la señal en estos casos, se llevó a cabo secando la membrana tras el último lavado y utilizando un equipo Typhoon TRIO (*Amersham Biosciences*).

TBS 10x: 1,5 M NaCl, 2 M Tris-HCl pH 7.6 (TBS: *Tris-buffered saline*)

Tampón TBS-T: TBS 1x, 0,1% Tween 20.

Solución de bloqueo: 5% de leche desnatada en polvo en TBS-T.

Anticuerpo	Especie	Dilución	Procedencia
Anti PTTG1	Policlonal conejo	1:4.000	Producción propia
Anti β -actina	Monoclonal raton	1:40.000	Sigma (monoclonal)
Anti MCP1 murino	Policlonal conejo	1:100	Peprotech
Anti SDF1 α murino	Policlonal cabra	1:100	Peprotech
Anti SDF1 α humano	Monoclonal raton	1:100	Cedido por Dr.Arenzana-Seisdedos (Instituto Pasteur)
Fas (N-18)	Policlonal conejo	1:100	Santa Cruz

Tabla 12. Anticuerpos primarios empleados.

Anticuerpo	Dilución	Casa Comercial
IgG Anti-ratón peroxidasa	1:10.000	Amersham
IgG Anti-conejo peroxidasa	1:8.000	Amersham
IgG Anti-cabra peroxidasa	1:2.000	Dako
Goat Anti-mouse	1:400	Jackson
IgG Cy3		Immunoresearch
Cy5	1:400	Amersham

Tabla 13. Anticuerpos secundarios empleados.

4.7 Array de citoquinas.

Para la determinación de los niveles de proteínas citoquinas y receptores de citoquinas se utilizó un array de proteínas RayBio® Mouse Cytokine Antibody Array (RayBiotech, Cat#M0309803) que contenía anticuerpos contra 62 proteínas citoquinas y sus receptores.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
1	POS	POS	POS	POS	Blank	Asl	BLC	CD80 L	CD80 T	CD40	CRG-2	CTACK	CXCL16	Eotaxin
2	NEG	NEG	NEG	NEG	Blank	Asl	BLC	CD80 L	CD80 T	CD40	CRG-2	CTACK	CXCL16	Eotaxin
3	Eotaxin-2	Fas Ligand	Fractalkine	GCSF	GM-CSF	IFN γ	IGFBP-3	IGFBP-5	IGFBP-6	IL-1a	IL-1b	IL-2	IL-3	IL-3 Rb
4	Eotaxin-2	Fas Ligand	Fractalkine	GCSF	GM-CSF	IFN γ	IGFBP-3	IGFBP-5	IGFBP-6	IL-1a	IL-1b	IL-2	IL-3	IL-3 Rb
5	IL-4	IL-5	IL-6	IL-9	IL-10	IL-12 p40/p70	IL-12 p70	IL-13	IL-17	KC	Leptin R	Leptin	LIX	L-Selectin
6	IL-4	IL-5	IL-6	IL-9	IL-10	IL-12 p40/p70	IL-12 p70	IL-13	IL-17	KC	Leptin R	Leptin	LIX	L-Selectin
7	Lymphotoctin	MCPI	MCP-5	M-CSF	MIG	MIP-1a	MIP-1g	MIP-2	MIP-3 b	MIP-3a	PF-4	P-Selectin	RANTES	SCF
8	Lymphotoctin	MCPI	MCP-5	M-CSF	MIG	MIP-1a	MIP-1g	MIP-2	MIP-3 b	MIP-3a	PF-4	P-Selectin	RANTES	SCF
9	SDF-1a	TARC	TCA-3	TECK	TIMP-1	TNF α	sTNF RI	sTNF RII	TPO	VCAM-1	VEGF	Blank	Blank	Blank
10	SDF-1a	TARC	TCA-3	TECK	TIMP-1	TNF α	sTNF RI	sTNF RII	TPO	VCAM-1	VEGF	Blank	POS	POS

Figura 15. Array de proteínas citoquinas analizadas en nuestro estudio.

Una vez se extrajeron las proteínas a partir de cultivos celulares, se procedió a preparar las membranas para su uso, realizando un bloqueo previo durante toda la noche a 4°C con buffer de bloqueo suministrado por la casa comercial. Las membranas bloqueadas se incubaron con 1mg de proteínas diluido en este mismo buffer durante 2h a temperatura ambiente. Se realizaron 3 lavados de 5min a temperatura ambiente con 2ml de buffer de Lavado I y 2 lavados de 5min con 2ml de buffer de lavado II, ambos suministrados por la casa comercial. Una vez lavada la membrana se incubó con anticuerpos primarios anti-citoquinas conjugados a Biotina en buffer de bloqueo durante 2h a temperatura ambiente.

Las membranas se lavaron de nuevo con buffer de lavado I y II repitiendo el proceso anterior y se procedió a realizar la incubación con HRP conjugada a estreptavidina diluida en buffer de bloqueo, durante 2h a RT. Tras otro proceso de lavado las membranas fueron reveladas. Para ello se preparó

una mezcla de los reactivos de detección A y B y se incubaron las membranas con esta mezcla durante 1min a RT. Seguidamente se retiró el exceso de buffer, se colocaron entre dos piezas de plástico transparentes eliminando cualquier burbuja y se expusieron a películas de rayos X. Las películas reveladas se escanearon en un Image Scanner (*Amersham*) y las imágenes se procesaron mediante el software ImageQuant. Cada anticuerpo estaba representado en la membrana por duplicado, además de contar con controles negativos y positivos dentro de cada una de las membranas.

4.8 Inmunofluorescencia indirecta

Las células se sembraron sobre lamelas y cuando alcanzaron una confluencia del 80%, las lamelas se lavaron con PBS1x y se fijaron con paraformaldehído 4% en buffer fosfato salino (PBS1x) durante 15min a RT. Se realizaron 2 lavados con PBS1x y se permeabilizaron las células con NP40 0,4% durante 5min a temperatura ambiente. Se volvieron a lavar las lamelas y se incubaron con buffer de bloqueo durante 1h a temperatura ambiente. Posteriormente, se procedió a incubar los cubreobjetos con los anticuerpos primarios en buffer de bloqueo, durante un mínimo de 30min a temperatura ambiente. Tras un nuevo proceso de tres lavados con PBSx1 se incubaron con los anticuerpos secundarios correspondientes en buffer de bloqueo durante un mínimo de 30min a RT. Antes de montar las lamelas en los portas, se lavaron otras tres veces en PBS1x y una vez más en H₂O destilada, se secaron las lamelas por el lado opuesto a las células y se procedió al montaje en los porta con la solución *DakoCitomation Fluorescent Mounting Medium* (DAKO). Las imágenes se tomaron con un microscopio Leica DM6000B y se analizaron mediante el software LAS AF.

Solución de bloqueo: 2% BSA, 5% Glicerol, 0,2% Tween 20, Azida-sódica 0,1% en PBS 1x.

Anticuerpo	Fuente/ origen	Procedencia	Dilución
Alexa Fluor 488 conjugated- anti-Rabbit IgG	Policlonal Cabra	Invitrogen	1:1000
Alexa Fluor 488 conjugated- anti-Mouse IgG	Policlonal Cabra	Invitrogen	1:1000

Alexa Fluor 546 conjugated- anti-Rabbit IgG	Policlonal Cabra	Invitrogen	1:1000
Alexa Fluor 546 conjugated- anti-Mouse IgG	Policlonal Cabra	Invitrogen	1:1000

Tabla 14. Anticuerpos secundarios empleados en inmunofluorescencia.

MM5. MICROSCOPIA

5.1 Microscopía de contraste de fase

De modo rutinario, las células *in vivo* se observaron y monitorizaron haciendo uso de un microscopio invertido (Leica). Uno de estos microscopios invertidos, contaba con una lámpara de UV y una cámara para la adquisición de imágenes proporcionada por el mismo fabricante. Las imágenes se procesaron a través del programa *LAS AF 1.8.2* (Leica).

5.2 Microscopía de fluorescencia

Las preparaciones de inmunofluorescencia indirecta se observaron usando un microscopio vertical Leica DM6000B. empleando el objetivo de inmersión 40x (*HGX PL APO CS 40x 1.25 OIL*). Para los distintos fluorocromos se usaron los filtros correspondientes.

Este microscopio se encontraba conectado a una cámara Leica DFC350 FX para la adquisición de imágenes monocromáticas, las cuales se procesaron a través del programa *LAS AF 1.8.2* (Leica).

MM.6 Ensayos de transactivación

Las interacciones proteína-DNA se detectaron indirectamente mediante ensayos *in vivo* de transactivación de promotores fusionados a luciferasa. Estos ensayos permiten detectar la unión de proteínas a secuencias específicas del DNA, midiendo los niveles de expresión del gen *luciferasa*. Estudios realizados en la Universidad Ludwig-Maximilians de Munich, mostraron que el gen MCP1 posee una regulación compleja, con nueve secuencias reguladoras localizadas hasta -24kb aguas arriba de su promotor.

De ellas, dos secuencias habían sido identificadas como potenciadoras (-2.4kb y -0.2kb), otra inhibidora (-1.0kb) y otras dos como putativos sitios de unión de factores de transcripción (-19.4kb y -16.3kb). Haciendo uso de estos plásmidos realizamos nuestros ensayos de transactivación (*Klaus Wagner et al., Genomics 2001*). Para ello se sembraron en placas de 12 pocillos 1.5×10^5 células NIH3T3cat y NIH3T3pttgB2 y tras 24 horas se transfectaron de forma transitoria utilizando Lipofectamina 2000 (Invitrogen) (apartado 7.1) y la siguiente combinación de plásmidos (a+b):

a) Plásmidos funcionales:

- **pluc 2.8/2**: porta el gen de la luciferasa y 2.8kb de la región reguladora de MCP1 donde se encuentra el promotor, una región potenciadora y una putativa región inhibidora.

- **pluc 2.8/5**: porta el gen de la luciferasa, las regiones presentes en **pluc 2.8/2** y dos regiones potenciadoras que se ha visto que responden a $\text{TNF}\alpha$.

- **pluc 0.5/5**: porta el gen de la luciferasa, la región promotora y las dos regiones potenciadoras que se ha visto que responden a $\text{TNF}\alpha$.

b) **pCMV-RL**: porta el cDNA de renilla, utilizada para monitorizar la eficiencia de transfección y para normalizar los valores actividad luciferasa obtenidos para corregir las diferencias debidas a dicha variable.

Dichos plásmidos se usaron en una proporción 10:1, respectivamente (1 μg de a, 100 ng de b/ pocillo). Tras 24 horas post-transfección, las células se indujeron 24 h con IPTG. Una vez transcurrido este tiempo se lisaron y la actividad luciferasa se determinó mediante el kit de detección *Dual-Luciferase Reporter* (Promega), siguiendo las indicaciones del fabricante.

MM7. Métodos de transfección

7.1 Transfección con sistemas lipídicos

Para este sistema de transfección se utilizó el reactivo Lipofectamina 2000 (*Invitrogen*). Las células se sembraron a una densidad adecuada para que en el momento de la transfección alcanzaran una confluencia del 95%, 24h antes de la transfección se reemplazó el medio completo por medio sin antibióticos. En el momento de la transfección se realizó una mezcla

Lipofectamina-DNA en una proporción 1:1; para placas de 6 pocillos, se añadieron 3µg de DNA en 250µl de Opti-MEM® (*Gibco*) y se incubaron 5min a temperatura ambiente. Al mismo tiempo, se realizó otra mezcla consistente en 3µl de Lipofectamina 2000 en 250µl de Opti-MEM® incubándolo 5min a RT. Se mezcló la Lipofectamina y el DNA cuidadosamente y se incubó durante 20min a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se añadieron 500µl de la mezcla a cada pocillo y se dejó actuar durante toda la noche; a la mañana siguiente se reemplazó el medio por medio completo fresco. Las células se incubaron a 37 °C, en atmósfera húmeda al 5% de CO₂ durante todo el proceso hasta el momento de su análisis.

7.2 Fugene 6

Las células se sembraron para que en el momento de la transfección se encontraran entre el 50 y el 70% de confluencia en medio sin suero. En función de los plásmidos empleados para la transfección, se utilizaron proporciones vol/peso de 3:1 o 3:2 Reactivo Fugene6 (µl): DNA (µg) para mejorar la eficiencia de la transfección. En el momento de la transfección se realizó la siguiente mezcla, para placas de 6 pocillos: se añadieron 3µl de Fugene6 en 100µl de Opti-MEM® y se mezclaron mediante golpecitos suaves. Se añadió 1µg de DNA a la solución anterior y se mezcló cuidadosamente. Se incubó durante 15min a temperatura ambiente y se repartieron gota a gota por el pocillo los complejos formados, alcanzando un volumen final de 2ml. Transcurridas 8 horas tras el proceso de transfección, se reemplazó el medio libre de suero (Opti-MEM®) por medio completo.

7.3 Fosfato cálcico

Las células se sembraron para que alcanzaran una confluencia del 80% en el momento de la transfección. Entre 30 minutos y 3 horas antes del proceso, se reemplazó el medio de cultivo por 8ml de medio fresco (para placas de 100mm de diámetro) donde se transfectarían un total de 30µg de DNA. Para cada transfección se preparó 0,5ml de 1xHBS, se añadió el volumen adecuado de DNA, mientras se agitaba suavemente, 30µl de 2,5 M CaCl por tubo y agua bidestilada hasta completar el volumen final indicado por

el fabricante. Tras incubar 20min a temperatura ambiente, se repartió la mezcla gota a gota por el pocillo y las células se incubaron a 37°C, en atmósfera húmeda al 5% de CO₂. Transcurridas 16h, se sustituyó el medio de transfección por medio fresco completo hasta el momento de su análisis; en los experimentos de sobreexpresión 24-48h y en los experimentos de interferencia la incubación fue de 48 a 72h.

7.4 Electroporación

Para llevar a cabo el procedimiento de electroporación es importante que los medios estuvieran bien atemperados (37°C). Este proceso se desarrolló haciendo uso de un electroporador *Amaga electroporation system* (Amaga). Las células, en este caso MCF7 (existen protocolos específicos para cada tipo celular), se tripsinizaron y se lavaron con PBS1x. Una vez lavadas, se contaron y se pasaron 10⁶ células a un eppendorf con 100µl de buffer de electroporación, se añadió 2µg de DNA y se pipeteó suavemente. Se pasó la mezcla a una cubeta de electroporación de 1mm y se eliminó cualquier burbuja. Se colocó la cubeta en el electroporador y se sometió a un programa de 140V, 10 pulsos de 1.5mseg a intervalos de 1.5 seg. Finalizado el proceso de electroporación se incubó 5min a temperatura ambiente y se traspasó la mezcla a un frasco pequeño de cultivo con 5ml de medio completo y se crecieron las células a las condiciones establecidas. Transcurridas 24h se renovó el medio de cultivo.

Para electroporar la línea celular MCF10a, se procedió del mismo modo descrito anteriormente con las siguientes variaciones: se empleó 1µg de DNA, se usaron 800.000 células/cubeta de electroporación y se aplicaron 6 pulsos con intervalos de 2 seg.

Buffer de electroporación: 2mM Hepes pH 7,2, 15mM Buffer K₂HPO₄/KH₂PO₄, 250mM Manitol, 1mM Cl₂Mg, se filtra y se guarda a -20°C.

7.5 Obtención de líneas estables

Las líneas estables se realizaron empleando distintos métodos de transfección según su eficiencia en los distintos tipos celulares. 48 horas post-

transfección, se añadió al medio de cultivo el antibiótico necesario para la selección de aquellas células que hubieran incorporado el o los plásmidos deseados. Para cada antibiótico de selección en cada línea celular se había realizado previamente una curva de citotoxicidad, estableciendo una concentración de selección y una concentración de mantenimiento para cada cultivo. De este modo pudimos ir seleccionando y manteniendo cada uno de los clones hasta el momento de su comprobación mediante técnicas de *western blot*.

7.6 Obtención de lentivirus

7.6.1 Transfección de células 293T

Para la obtención de partículas lentivirales se sembraron 3×10^6 células A293T en placas de 100mm para alcanzar una confluencia del 80%. Transcurridas 24 horas se realizó el protocolo de transfección con fosfato cálcico (apartado 7.3) y la siguiente combinación de plásmidos (a+b+c):

a) Plásmidos funcionales:

- pHRSIN-DUAL-GFP-shRNA-Pttg1 o pLKO.1-GFP-158 o los correspondientes plásmidos vacíos (pHRSIN-DUAL-GFP o pLKO.1-GFP, respectivamente).

b) pCMVDR 8.91 (*packaging plasmid*).

c) pMDG (VSV-G, *envelope plasmid*).

Dichos plásmidos se usaron en una proporción 3:2:1 respectivamente (se emplearon 30 µg totales de DNA, 15 µg de a: 10 µg de b: 5 µg de c, por placa de 90 mm de diámetro). Tras 72 horas de incubación, se recogió el sobrenadante del cultivo y se pasó por un filtro de PVDF de 0,45 µm de diámetro.

7.6.2 Concentración de partículas virales

Dicho sobrenadante se concentró mediante ultracentrifugación a 26.000 rpm (centrífuga Avanti J-30I, rotor SW28, Beckman Coulter) durante 2,5 horas minutos a 4°C. El precipitado de partículas virales resultante se

resuspendió en aproximadamente 100 μ l finales de Opti-MEM®, se hicieron alícuotas y se guardaron a -80°C.

7.6.3 Titulación por citometría de flujo

La titulación de las partículas virales obtenidas, es decir, el número de partículas lentivirales infectivas por ml de medio de cultivo (TU/ml) (*Transducing units*) se determinó por citometría de flujo. Para ello, se sembraron $1,5 \times 10^4$ células A293T en placas de 12 pocillos y se infectaron con distintas cantidades de sobrenadante lentiviral concentrado que oscilaba entre 0,1 μ l y 2 μ l. La infección se realizó en presencia de polybrene (Sigma) a una concentración final de 4 μ g/ml. Transcurridas 72h tras la infección, se recogieron las células en PBS1x y se analizó el porcentaje de células GFP positivas por citometría de flujo. Como control de autofluorescencia se usaron las células no infectadas. Con el porcentaje de células fluorescentes (infectadas) se calculó el número de partículas infectivas presentes por μ l de sobrenadante viral obtenido, con capacidad de infectar a células diana (MOI, *Multiplicity of infection*).

7.6.4 Infección lentiviral

Para infecciones con lentivirus, las células se sembraron 24 horas antes de la infección ($3-5 \times 10^4$ células en pocillo de 6) una vez estuvieron pegadas las células se realizó la infección viral añadiendo polybrene (4 μ g/ml) a 1ml de medio de cultivo y las partículas virales necesarias para una infección a MOI=1 (sobrexpresión de PTTG1) o MOI=5 (interferencia de PTTG1), en función del estudio a realizar. Transcurridas de 12-14h se reemplazó el medio de cultivo por medio fresco y se fueron amplificando las líneas infectadas para realizar los experimentos deseados, realizando en todo momento controles de trazabilidad por citometría de flujo (células positivas para GFP), expresión o interferencia del gen *pttg1* por PCR tiempo real y sobreexpresión o bajada de los niveles de proteína PTTG1 por *western blot*. Como control, se utilizaron células infectadas con partículas lentivirales obtenidas con el vector pSIN-DUAL-GFP2. Las infecciones en las líneas humanas se realizaron previamente a los experimentos, y se mantuvieron a corto plazo.

MM.8 Citometría de flujo

8.1 Ciclo celular

El estudio del ciclo celular se llevó a cabo por citometría de flujo. Para ello las células se recogieron mediante el proceso de tripsinización y se pasaron a tubos de 15ml de poliestileno. Se centrifugaron 5min a 500gy se realizó un lavado con PBS. Tras el lavado, se retiró el sobrenadante y se fijaron los pellet en etanol al 70%, añadiéndolo gota a gota mientras se agitaban suavemente en un vortex. Tras una incubación de 18h a 4°C, se centrifugaron las muestras a 1800g 10min, se resuspendieron los pellet en 100µl de tampón FACS* y se incubaron 30min a 37°C en oscuridad. En el momento del análisis, el volumen final se completó con PBS hasta 0,5ml .La adquisición de las muestras se realizó en un citómetro FACSCalibur (BD), con el programa CellQuest 5.2.1-Pro (BD), analizando 10.000 eventos. El análisis de los datos obtenidos se realizó mediante el programa Infinicyt (Cytognos).

Solución de fijación: 70% Etanol. Almacenar a 4°C.

Solución de marcaje: PI 50 µg/ml y RNAsa-A 250 µg/ml en PBS 1x. Preparar justo antes de usar.
--

8.2 Muerte celular

La detección de células muertas se realizó mediante tinción *in vivo* con IP. Dicha tinción se llevó a cabo resuspendiendo los pellet obtenidos tras recoger y lavar las células en PBS 1x, en una dilución 1/1000 de IP en PBS1x, de forma inmediata se realizó el análisis por citometría de flujo para detectar aquellas células en las que por pérdida de la integridad de su membrana, se hubiera el compuesto. .

8.3 Ensayo Anexina V

Antes de que las células hayan perdido la integridad de sus membranas, ya han comenzado a desencadenarse mecanismos tempranos que inducen hacia la muerte celular. Uno de estos marcadores bioquímicos es la presencia de Fosfatidilserina en la membrana externa de la célula, a la cual se une la molécula de Anexina V, permitiéndonos su detección. Las células

procedentes de los distintos experimentos se procesaron de la siguiente manera. Los sobrenadantes celulares se recogieron en tubos limpios (para rescatar células que se encontraran flotando) y tripsinizamos las células adheridas. Una vez realizado el proceso de inactivación de la tripsina, se unieron con su sobrenadante correspondiente, se centrifugaron 5min a 500g a RT y se lavaron 2 veces con PBS 1x.

El marcaje con Anexina V, se realizó haciendo uso de un kit de detección de apoptosis *Annexina V-DY634 (Inmunostep)* siguiendo las instrucciones del fabricante. La adquisición de las muestras se realizó en un citómetro FACSCalibur (BD), con el programa CellQuest 5.2.1-Pro (BD), analizando 10.000 eventos y el análisis de los datos obtenidos se realizó mediante el programa Infinicyt (Cytognos).

MM.9 Viabilidad celular

9.1 Tinción con Sulforrodamina B

La sulforrodamina B (SRB) es un colorante de aminoxantano que posee afinidad por los aminoácidos básicos de las proteínas, reflejando el contenido proteico de la célula y su viabilidad. Para realizar esta técnica se sembraron 3×10^4 células/pocillo en placas de 24 pocillos. Transcurrido el tiempo establecido para el experimento, se aspiró el sobrenadante y se añadió 300µl de tricloroacético al 10% frío, dejando la placa a 4°C durante 30min. Se lavó cada pocillo 3 veces con agua destilada y se dejó secar a temperatura ambiente o en estufa a 40°C. Una vez seco, a cada pocillo se añadió 500µl de una solución de sulforrodamina (SRB) al 0.4% en ácido acético al 1%. Se dejó incubar 20min a RT y tras ese periodo de tiempo, se eliminó el exceso de SRB lavándose los pocillos 3 veces con ácido acético al 1%. Se dejó secar a RT en oscuridad y se solubilizó el colorante fijado a las células con 500µl de una solución 10mM Tris-base (pH: 10.5) con agitación suave. Se transfirieron 100µl de sobrenadante de cada muestra problema a placas de 96 pocillos (cada muestra por triplicado) y se midió la absorbancia en un equipo *Varioskan Flash* (Thermo electrón Corporation) a 492nm.

MM.10 Ensayos celulares *in vivo*

10.1 Migración celular: Ensayo de Herida

Los ensayos de migración celular requieren del uso de un microscopio invertido con cámara de cultivo (*Time-Lapse, Leica*). Al tratarse de una técnica de microscopía, se emplearon cámaras con fondo de vidrio (*Lab-TekTM II Chambered Coverglass Nunc*) y opcionalmente se trataron con una dilución de matrigel en H₂O (1:30), en los casos en los que el vidrio no estuviera tratado previamente, dejándolos secar en la campana de flujo laminar. Una vez secas las cámaras de cultivo, se sembraron 2×10^4 células en cada pocillo (en función del tipo celular). 24h tras la siembra, se añadió IPTG al medio de cultivo para inducir la sobreexpresión del gen de interés, para los casos de cultivos infectados con lentivirus, este paso no fue necesario. Tras 18h de inducción con IPTG se realizó una herida en la placa empleando una punta amarilla o blanca, según la velocidad de avance de la línea en estudio. En algunos casos se emplearon insertos de cultivo de silicona (ibidi) adheridos a la cámara con fondo de vidrio colocados previamente antes de realizar la siembra. En estos casos, las células se sembraron a ambos lados del inserto y una vez que el cultivo alcanzó la confluencia adecuada, se retiraron los insertos cuidadosamente con unas pinzas y se lavó cada pocillo con PBS1x para eliminar las células flotantes, añadiendo Opti-MEM® o medio de cultivo con 1%FBS. En este momento, la placa se colocó en el microscopio invertido con cámara de cultivo que previamente había alcanzado las condiciones 37°C y 5% CO₂. Se fijaron las posiciones de la herida que iban a ser fotografiadas durante 24h en intervalos de 15min, seleccionando entre 4 y 8 posiciones por condición. Los resultados obtenidos se analizaron mediante el software *Metamorph (Leica)* y se midió el porcentaje de área ocupada por células en función del tiempo.

10.2 Análisis de migración: Ensayos de “Tracking”

Para el análisis de la migración de células individuales se utilizó el programa Image J (Fiji), con la aplicación *MTrackJ* se obtuvo información del

movimiento (posición, velocidad, distancia.) de cada célula analizada. Se eligieron distintas células al azar en el cultivo y se marcaron con un punto rojo que se situó justo en el centro de la célula. Esto se hacía fotograma a fotograma desde el inicial hasta el final. Obteniendo una trayectoria de puntos que el programa convirtió en un trazado.

MM.11 Modelos animales

11.1 Xenotransplante ortotópico de mama

Las células (Mcf7luc virPTTG1/GFP/iRNA PTTG1) que iban a ser inyectadas en el tejido mamario de ratonas, se resuspendieron en una proporción 1:1 (v/v) de medio de cultivo (2×10^6 células/50 μ l) y matrigel, y se mantuvieron en hielo hasta el momento de la microinyección para evitar la gelificación del matrigel. Se emplearon ratonas atímicas Crl: UN-Foxn1^{nu} de 4-5 semanas de edad y se procedió a anestesarlas mediante una mezcla de Rompum y Ketamina. A partir de este momento se mantuvo la temperatura corporal de los animales mediante el uso de una placa térmica para evitar la hipotermia debida a la anestesia durante el procedimiento quirúrgico.

En primer lugar, se realizó el implante del tratamiento hormonal insertando una pastilla de 17 β -estradiol (1,7mg Innovative research) en la zona del cuello a través de una pequeña incisión y posterior sutura de la misma. Para el proceso de xenotransplante ortotópico, se realizaron distintas microinyecciones de células de adenocarcinoma de mama MCF7luc virPTTG1, MCF7luc vir-iRNA-PTTG1 y MCF7luc virGFP mezcladas con matrigel, de modo subcutáneo en el tejido graso de la cuarta mama de ratonas atímicas (fat-pad mamario) en dos grupos de 15 ratonas atímicas cada uno. Este proceso se realizó con exhaustivo cuidado utilizando una jeringa de tuberculina. Una vez realizado el xenotransplante, se dejó un periodo de recuperación a los animales de varios días antes de comenzar con el seguimiento del proceso tumoral, mediante técnicas de imagen *in vivo*.

El análisis de imagen *in vivo* se realizó haciendo uso del Sistema de Imagen Xenogen IVIS 50, capaz de detectar bioluminiscencia (fotones) emitida por las células que contienen el gen luciferasa, tras añadir el reactivo luciferina

de modo intraperitoneal. Con ayuda del software Xenogen Living Image se pudo realizar una cuantificación de la bioluminiscencia emitida por cada animal. Durante un total de 15 semanas, en intervalos de dos semanas, se analizaron los tumores mediante este sistema de imagen, inyectando intraperitonealmente el reactivo luciferina para detectar el crecimiento, localización del tumor y posibles metástasis.

Previamente se realizaron experimentos control, para comprobar el correcto comportamiento bajo las condiciones de nuestros ensayos, de la línea MCF7luc (adenocarcinoma de mama no metastásico) y la línea MDA-MB-231luc4175 (adenocarcinoma de mama metastásico) en xenotransplantes ortotópicos en mama. Se realizó un seguimiento de los dos grupos control de ratonas transplantadas durante 8 semanas, y en el caso de las ratonas transplantadas ortotópicamente con la línea MDA-MB-231luc4175, se extirpó quirúrgicamente un tumor primario de gran tamaño transcurridas las dos primeras semanas. Durante el desarrollo del experimento control utilizamos el Xenogen para detectar la localización de las células inyectadas y las posibles metástasis originadas.

11.2 Técnicas de Imagen in vivo.

Para llevar a cabo el seguimiento del crecimiento o disminución del tumor, su localización y aparición de posibles metástasis a lo largo de todo el proceso experimental, se utilizó el Sistema de Imagen IVIS 50 Xenogen, que consiste en una cámara CCD fría situada en una caja negra. Mediante técnicas de bioluminiscencia, nos permitió detectar la localización de las células implantadas, inyectando intraperitonealmente 200 μ l (15mg/ml) del reactivo luciferina y dejando transcurrir 15min para permitir que el reactivo se extendiera por el organismo, antes de introducir al animal en la cámara de anestesia y posteriormente en la cámara de bioluminiscencia, para realizar la captación de fotones emitidos. La señal obtenida (fotones/segundo) se cuantificó utilizando el software *Xenogen Living Image*.

11.3 Medida del tumor

Las medidas del tumor se realizaron semanalmente a cada ratona durante 15 semanas, haciendo uso de un caliper digital. Se determinó el diámetro mayor (D) y el diámetro menor (d) de cada tumor y se calculó el volumen del tumor utilizando la fórmula $Dxd^2/2$.

11.4 Análisis histológico

11.4.1 Necropsia

Para el análisis de los órganos, se procedió al sacrificio de los animales se sacrificaron mediante técnicas de dislocación cervical y se realizó la completa extracción de los órganos mediante laparostomía media. En primer lugar se localizaron los tumores, en los casos que estuvieran presentes, y se extirparon disecando el tumor de la piel colindante en el caso de adenocarcinoma de mama. Posteriormente se extrajeron el bazo y páncreas, tras estos, se realizó un corte en el extremo terminal del colon y en el esófago, justo antes de desembocar en el estómago, esto permitió extraer en bloque el intestino grueso, el intestino delgado y el estómago. Una vez realizada esta operación se extrajeron ovarios y útero, diafragma, hígado, riñones, pulmones y corazón, en este orden. Todos los órganos se fijaron y conservaron en formol al 10%.

11.4.2 Inclusión en parafina.

La inclusión en parafina confiere a la muestra una dureza que impide su fragmentación durante el corte, mantiene la estructura histológica y permite la obtención de cortes muy finos, regulares y homogéneos. Para ello la muestra se cortó con el bisturí en pequeños trozos de 3-4 mm y se introdujo en un pequeño cestillo de plástico para su inclusión, que consiste básicamente, en la sustitución del agua tisular por un medio sólido de inclusión. Para ello la muestra se sometió a una serie de procesos realizados por un equipo automático modelo Autotechnicón Leica TP1020. Este equipo está formado por 12 cubetas en las que se incubaba consecutivamente la muestra para completar el proceso de inclusión en parafina.

11.4.3 Parafinado de muestras

Una vez procesadas las muestras, el último paso fue la elaboración de bloques, que consistía en obtener un bloque sólido de tejido incluido y rodeado por parafina. Para ello se empleó un dispensador de parafina (Leica EG1150C) que contenía parafina líquida. En este paso se emplearon moldes de plástico (desechables), donde se vertía cierta cantidad de parafina y se colocaban las muestras orientándolas de forma que el plano de corte mirara al fondo del bloque y que los lados de la pieza quedaran paralelos al molde. Después se colocaba una parte del casete encima encastrándolo con más parafina y al enfriarse el bloque, se podía separar del molde, teniendo preparada la pieza para el corte. Para este último paso se utilizó una placa refrigeradora donde se ponían a enfriar los bloques una vez formados.

11.4.4 Tallado del bloque

El exceso de parafina que rodeaba la pieza se quitaba mediante cortes sucesivos con la cuchilla de bisturí, de modo que quedara un prisma que contenía la pieza. Si se deseaba montar los cortes en series se reducía el volumen del prisma, a fin de colocar el mayor número de secciones sobre él mismo porta. Si los cortes se montaban individuales este detalle carecía de importancia y podían dejarse varios mm de parafina alrededor de la pieza.

La temperatura del bloque de parafina en el momento de realizar los cortes era de 5° a 10°C, para ello se almacenaban en una cámara frigorífica a 4° o se enfriaban en hielo.

11.4.5 Corte con microtomo

El bloque se colocaba en la pinza portabloques del microtomo y se devastaba la primera parte hasta obtener en cada corte la superficie completa del tejido, esto se hacía con cortes gruesos a 20 micras. Para empezar a cortar la muestra se ajustaba el microtomo Leica RM 2255 para la realización de cortes más finos, de 5 micras seriados y paralelos. Los cortes se recogían con ayuda de un pincel y se llevaban al baño de flotación, previamente se le añadía en el porta alcohol de 70° para que se estirasen bien. La temperatura del baño

de flotación era de 40° C, se dejaban los cortes en el baño de 30 seg a 2min, tiempo necesario para que se estirasen bien y a continuación se realizaba la pesca de los cortes con portas gelatinizados. Posteriormente se dejaban escurrir, colocándolos de forma inclinada durante un periodo de 2 a 5 minutos. La desecación se realizaba colocando los portas en estufa de 37°C hasta el día siguiente, aunque también se podían secar a 60°C durante 10 a 20 min.

11.4.6 Tinción Hematoxilina-eosina

En el momento de realizar la tinción, se procedió al desparafinado de las muestras mediante dos incubaciones con Xilol, sumergiendo la cestilla durante 15min en cada cubeta. Seguidamente, se llevó a cabo la hidratación de las muestras mediante sucesivas inmersiones en gradaciones decrecientes de alcohol (dos pasos de alcohol de 100°, un paso de alcohol de 96°, un paso de alcohol de 86° y un último paso de alcohol de 70°) durante 15seg y finalmente un lavado en agua durante 15seg. Tras la hidratación de las muestras, se realizó la tinción indicada sumergiendo la cestilla en el colorante Hematoxilina durante 3min, lavándose con agua corriente para retirar el exceso de colorante y sumergiéndose en alcohol ácido durante 15seg. De nuevo se volvió a lavar con agua corriente, y se introdujo en una cubeta con el colorante eosina durante 2min. Otro paso de lavado y se inició el proceso de deshidratación. Para llevar a cabo este último paso, se procedió a sumergir la cestilla durante un instante en cubetas con concentraciones crecientes de alcohol, en sentido contrario al indicado en el proceso de hidratación. Finalmente se realizó el aclarado de las muestras mediante dos pasos de 15seg en Xilol. Los portaobjetos se dejaron secar en una estufa de 37°C o a RT antes de ser montados.

El análisis histológico fue realizado por la Dra. Carmen Sáez perteneciente al Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Virgen del Rocío.

RESULTADOS

Parte I: Estudiar la capacidad moduladora que ejerce el gen *pttg1* sobre la expresión de genes relacionados con el microambiente del tumor, en células inmortalizadas de ratón NIH3T3.

1. Caracterización de los sistemas de sobreexpresión de PTTG1 en células de ratón.

Se han puesto a punto herramientas sobre las que desarrollaremos nuestro estudio de investigación. Para ello se generaron modelos de sobreexpresión del gen *pttg1* en fibroblastos inmortalizados de ratón NIH3T3 que consistían en dos sistemas inducibles de sobreexpresión y un tercer sistema constitutivo, que permitían establecer diferentes niveles de expresión del gen *pttg1*:

- Sistemas inducibles: LacI (Stratagen) y Tet-on (Clontech).
- Sistema constitutivo: Lentivirus

Para el sistema inducible de sobreexpresión disponíamos de dos líneas estables con el gen *pttg1* bajo un promotor inducible por IPTG (Tabla 7 Materiales y métodos) nombradas como NIH3T3pttgB2 y NIH3T3pttgB3. Como control se utilizó la línea NIH3T3 establemente transfectada con el gen *cloranfenicol acetil transferasa (cat)* bajo el mismo promotor inducible por IPTG. Mediante PCR tiempo real y ensayos de *western blot*, se comprobó la sobreexpresión regulada de este gen a nivel de ARN mensajero y proteína, y se seleccionó, el tiempo de inducción y concentración de IPTG que permitía la mayor acumulación de la proteína PTTG1 en la célula (figura 16).

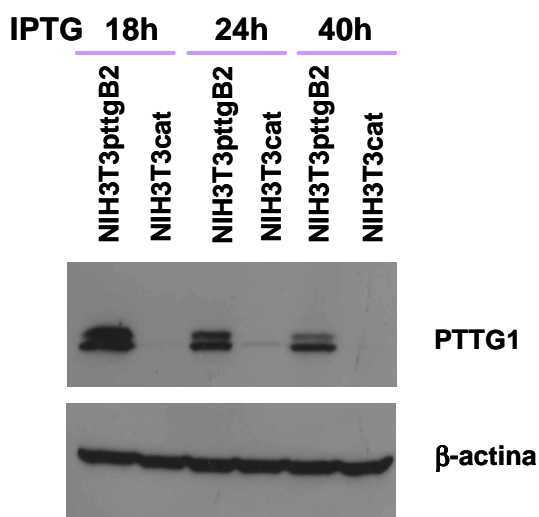


Figura 16. Cinética de inducción de la proteína PTTG1 por IPTG, utilizando las líneas NIH3T3pttgB2 y NIH3T3cat, tratadas con IPTG a una concentración de 4mM, durante 18h, 24h y 40h. Se utilizó la proteína β-actina como control de carga.

El segundo modelo de sobreexpresión inducible, se generó

mediante el Sistema de Expresión de Genes Inducibles Tet de Clontech (Tet-on). En la figura 17 se muestra como con la adición de doxíciclina para inducir el sistema, además de seleccionar clones resistentes al antibiótico, se sobreexpresaba la proteína PTTG1.

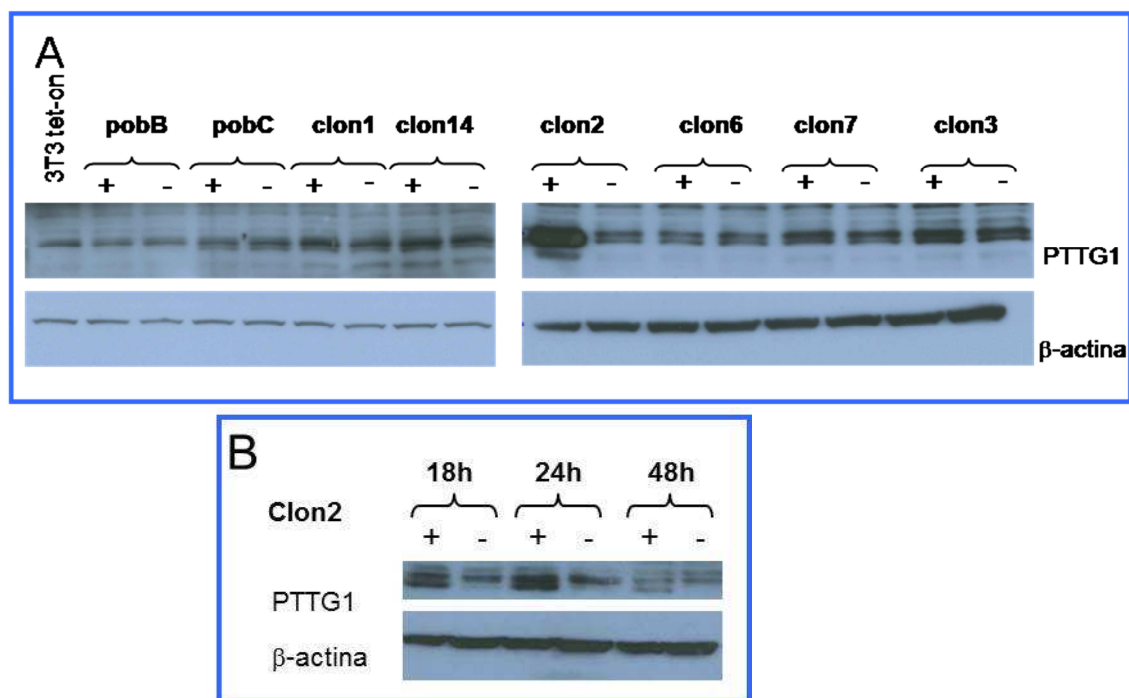


Figura 17. (A) Obtención de líneas estables inducibles por doxíciclina mediante el sistema tet-on. Se analizaron 3 poblaciones y 15 clones, (+) doxíciclina y (-) doxíciclina. El clon 2 mostró niveles elevados de PTTG1 tras el tratamiento con 2mg/ml de doxíciclina durante 18h. **(B)** cinética de inducción del clon 2 con 2mg/ml de doxíciclina a 18h, 24h y 48h. Como control de carga se utilizó el anticuerpo anti-β-actina.

El tercer modelo utilizado fue un sistema de sobreexpresión constitutiva mediante infección lentiviral. El vector lentiviral contenía el gen *pttg1* y el gen GFP o sólo GFP en el lentivirus control. La línea celular NIH3T3 infectada se analizó mediante citometría de flujo, para determinar el porcentaje de población positiva para GFP, infectada con el lentivirus. Mediante *western blot* se confirmó que la población seleccionada, además sobreexpresaba la proteína PTTG1 (Figura 18A y 18B).

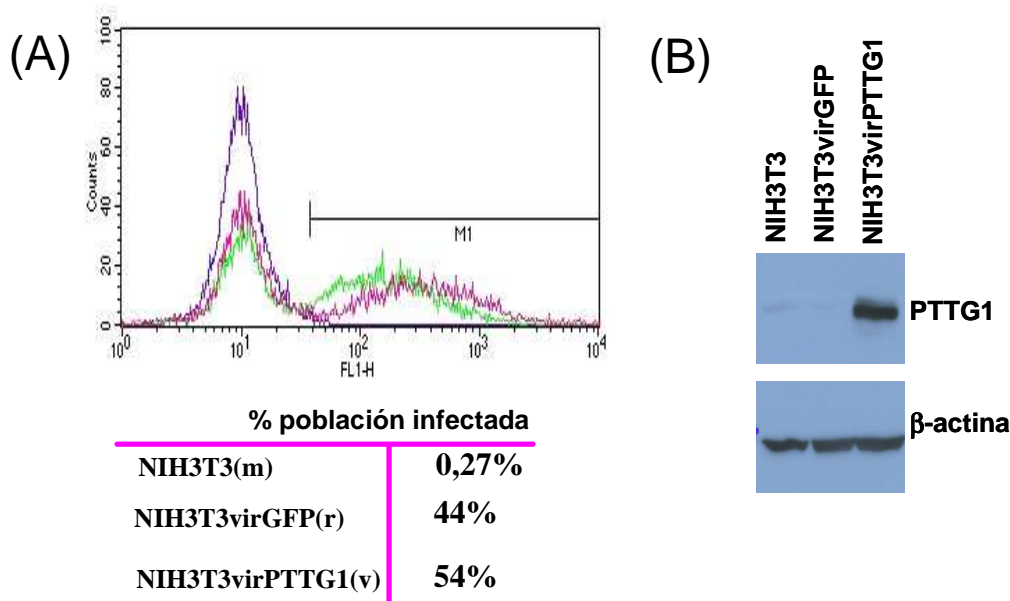


Figura 18. (A) Citometría de flujo de la línea NIH3T3 infectada con lentivirus que expresan los genes *pttg1* y *gfp* (en verde) o sólo *gfp* (en rosa). Determinación del porcentaje de células infectadas con las distintas construcciones lentivirales. (B) Confirmación mediante *western blot* del aumento de expresión de la proteína PTTG1 en las células NIH3T3virPTTG1 respecto a sus controles.

Al ser un sistema heterólogo, mediante la técnica PCR en tiempo real se determinó el número de copias de mRNA de *Pttg1* murino y *Pttg1* humano en las líneas NIH3T3cat, NIH3T3pttgB2 y NIH3T3pttgB3, elaborando para ello rectas patrones para cada gen y empleando sondas Taqman. En la figura 19 se muestra como los niveles de mRNA *Pttg* murino en ambas líneas eran similares, mientras que los niveles de mRNA *Pttg1* humano eran diferentes en las dos líneas establemente transfectadas NIH3T3pttgB2 y NIH3T3pttgB3.

La cuantificación de la proteína PTTG1 en las líneas NIH3T3cat y NIH3T3pttgB2, se determinó elaborando rectas patrón con cantidades conocidas de proteína recombinante PTTG de ratón y PTTG1 humana. El anticuerpo anti-PTTG1 reconoce ambas proteínas. En la figura 20, se muestra el valor obtenido en la muestra NIH3T3pttgB2 que corresponde al sumatorio de proteína PTTG1 de ratón endógena y proteína PTTG1 humana sobreexpresada.

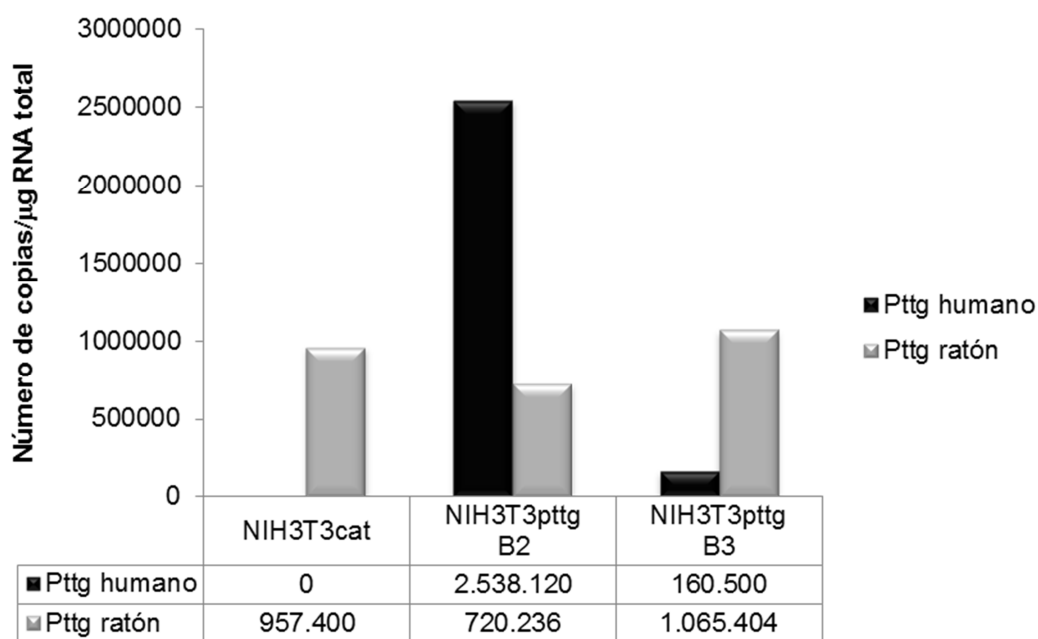


Figura 19. Cuantificación del número de copias de mRNA Pttg1murino (azul claro) y Pttg1humano (azul oscuro) por 1µg de RNA total en las líneas celulares NIH3T3cat, NIH3T3pttgB2 y NIH3T3pttgB3. Los niveles de RNAm se determinaron utilizando sondas taqman específicas para cada gen y mediante la elaboración de rectas patrón.

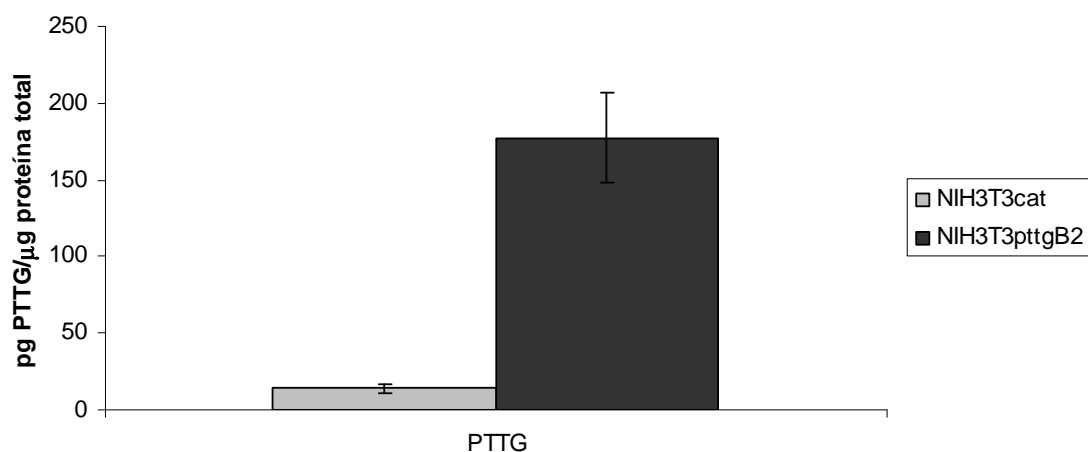


Figura 20. Cuantificación de los niveles de proteína PTTG, en las líneas NIH3T3cat y NIH3T3pttgB2 mediante la elaboración de rectas patrón de proteína recombinante PTTG de ratón y PTTG humana.

2. Cambios en el patrón de expresión génica producidos por la sobreexpresión de PTTG1.

2.1 Array de RNA mensajero

Una vez caracterizados los sistemas de sobreexpresión se determinaron posibles cambios en la expresión de otros genes modulados por la sobreexpresión de *pttg*. Para ello se realizó un array de RNAm, empleando la plataforma *Agilent* y el chip (MOE 430) de ratón.

Los arrays de RNA mensajero se realizaron con triplicados independientes pertenecientes a la línea control NIH3T3cat y a la línea NIH3T3pttgB2 tratadas con IPTG durante 18 horas. El resultado identificó de forma estadísticamente significativa ($p < 0,05$) que la sobreexpresión del gen *pttg1* afectaba los niveles de expresión de un conjunto de 407 genes, aumentando y disminuyendo la expresión de 296 y 111 genes respectivamente.

Para caracterizar a nivel funcional los genes desregulados, se empleó la herramienta bioinformática Enrichr y DAVID versión 6.7 (*Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery*) que nos permitió entre otras opciones, detectar enriquecimientos en ontologías génicas (GO), categorías funcionales, rutas afectadas e interacciones de proteínas. Los arrays mostraban cambios de expresión que afectaban a familias de genes relacionadas con la adhesión celular, migración y desarrollo (Figura 21).

En cuanto a las rutas funcionales, encontramos afectadas rutas de interacción de citoquinas con sus receptores, interacción de ECM-receptores, adhesión focal, comunicación celular y rutas de cáncer (Figura 21), centrándonos en identificar genes implicados en modular el microambiente del tumor.

Sobreexpresión de PTTG1 incrementa:

Rutas asociadas a:

cytokine cytokine receptor interaction

focal adhesion

pancreatic cancer

Función Biológica asociadas a:

cell-cell adhesion (GO:0098609)

cell-cell adhesion via plasma-membrane adhesion molecules (GO:0098742)

homophilic cell adhesion via plasma membrane adhesion molecules (GO:0007156)

positive regulation of cellular component movement (GO:0051272)

positive regulation of cell migration (GO:0030335)

positive regulation of cell motility (GO:2000147)

positive regulation of locomotion (GO:0040017)

extracellular matrix organization (GO:0030198)

Sobreexpresión de PTTG1 disminuye:

Rutas asociadas a:

ecm receptor interaction

cell communication

focal adhesion

Función Biológica asociadas a:

very long-chain fatty acid metabolic process (GO:0000038)

brown fat cell differentiation (GO:0050873)

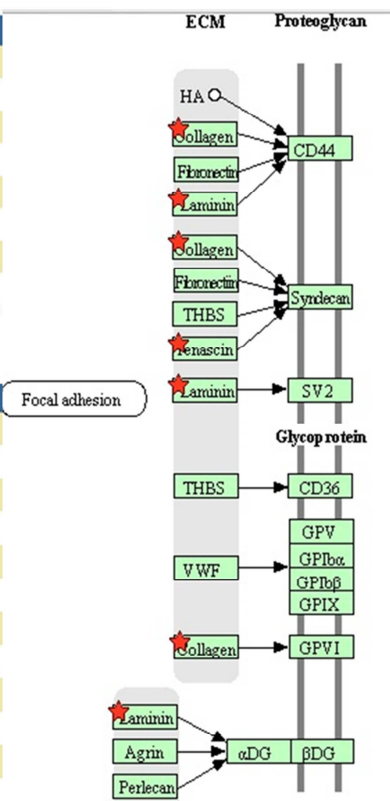
Figura 21. Array de mRNA de células NIH3T3cat *versus* células NIH3T3pttgB2. (a) Genes que modifican su expresión agrupados según su función biológica y analizados mediante las herramientas Enrichr y David Bioinformatics Resources 6.7.

Interacción receptor-ECM :

OFFICIAL_GENE_SYMBOL	GENE NAME
Col4a6	collagen, type IV, alpha 6
Col5a2	collagen, type V, alpha 2
Col11a1	collagen, type XI, alpha 1
Itga11	integrin alpha 11
Itga6	integrin alpha 6
Itgb7	integrin beta 7
Lamc2	laminin, gamma 2
Tnxb	tenascin XB

Adhesión focal:

OFFICIAL_GENE_SYMBOL	GENE NAME
Col4a6	collagen, type IV, alpha 6
Col5a2	collagen, type V, alpha 2
Col11a1	collagen, type XI, alpha 1
Egfr	epidermal growth factor receptor
Igf1	insulin-like growth factor 1
Itga11	integrin alpha 11
Itga6	integrin alpha 6
Itgb7	integrin beta 7
Lamc2	laminin, gamma 2
Tnxb	tenascin XB
Vegfc	vascular endothelial growth factor C



Moléculas de adhesión de la célula :

OFFICIAL_GENE_SYMBOL	GENE NAME
Cd8b1	CD8 antigen, beta chain 1
H2-D1	histocompatibility 2, D region; histocompatibility 2, D region locus 1
H2-K1	histocompatibility 2, K1, K region; similar to H-2K(d) antigen
Itga6	integrin alpha 6
Itgb7	integrin beta 7
Ncam1	neural cell adhesion molecule 1
Nrxn1	neurexin I
Pvrl2	poliovirus receptor-related 2

Citoquinas:

OFFICIAL_GENE_SYMBOL	GENE NAME
Acvr1l	activin A receptor, type II-like 1
Bmp7	bone morphogenetic protein 7
Ccl2	chemokine (C-C motif) ligand 2
Ccl7	chemokine (C-C motif) ligand 7
Cxcl12	chemokine (C-X-C motif) ligand 12
Cx3cl1	chemokine (C-X3-C motif) ligand 1
Egfr	epidermal growth factor receptor
Kitl	kit ligand
Lepr	leptin receptor
Tgfb2	transforming growth factor, beta 2
Tgfb2	transforming growth factor, beta receptor II
Vegfc	vascular endothelial growth factor C

Figura 22. Listado de genes que varían en las principales rutas alteradas por la sobreexpresión de *pttg1*.

Nombre	Abrev.	Veces de inducción	Función
chemokine (C-C motif) ligand 2	ccl2	3,6	Infiltración de células Sistema inmune, bloquea autofagia, migración
chemokine (C-X-C motif) ligand 12	cxcl12	8,1	Quimiotaxis, supervivencia celular, la proliferación, la angiogénesis y la metástasis
vascular endothelial growth factor C	vegf c	11	Angiogénesis
chemokine (C-C motif) ligand 7	ccl7	3	Migración e invasión
bone morphogenetic protein 7	bmp7	2,2	Migración e invasión
delta-like 1 homolog (Drosophila)	dlk1	7,9	Desarrollo
insulin-like growth factor 2 receptor	igf2r	0,09	Regula expresión de α V-integrina
matrix metalloproteinase 17	mmp17	2,5	Rotura de matriz extracelular
epidermal growth factor receptor	egfr	2,4	Proliferación
insulin-like growth factor binding protein 7	igfbp7	2,3	Crecimiento celular
insulin-like growth factor 1	igf1	3,1	Proliferación
transforming growth factor, beta receptor II	tgfb2	2,1	Proliferación, diferenciación, adhesión y migración
transforming growth factor, beta 2	tgfb2	3,9	Proliferación, diferenciación, adhesión y migración
SPARC related modular calcium binding 2	smoc-2	19,5	Estimula proliferación Regula migración

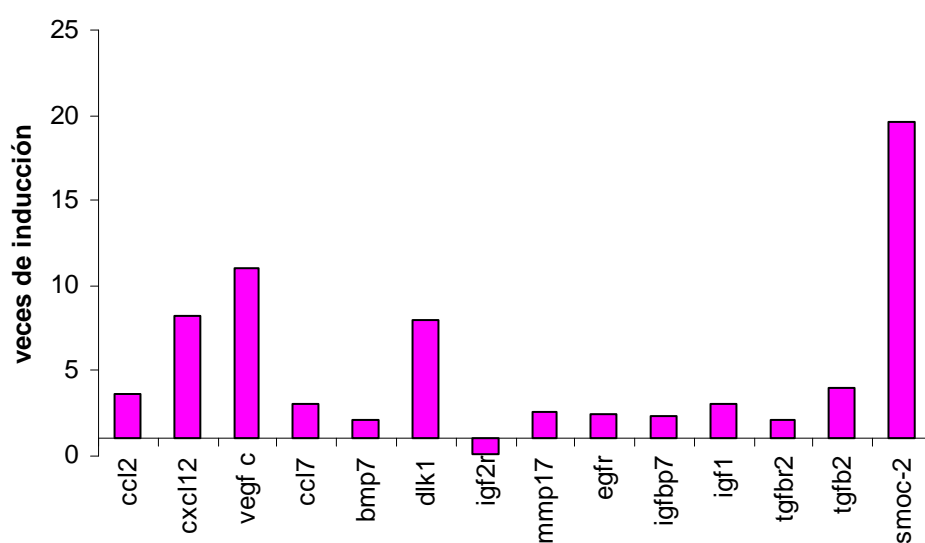


Figura 23. Tabla y gráfica que muestran los genes que varían su expresión y son de mayor interés para nuestro estudio.

Se identificaron los siguientes genes inducidos: VEGFc (11 veces), Dlk1 (7,9 veces), TGFb2 (3,9 veces), Smoc-2 (19,5 veces) y las quimioquinas CXCL12 (8 veces) y CCL2 (3,6 veces).

Se estudió la capacidad de las citoquinas CXCL12 (SDF1 α) y CCL2 (MCP1) para favorecer el desarrollo del tumor y su relación con *pttg1*. Estos resultados, que apoyaban nuestra hipótesis inicial de la implicación de *pttg1* en el proceso tumorigénico mediante la activación o represión de genes relacionados con el microambiente tumoral.

A nivel de ciclo celular, las líneas NIH3T3cat, NIH3T3pttgB2, NIH3T3virpttg y NIH3T3virgfp no mostraban diferencias en ninguna de las fases del ciclo como se aprecia en la figura 24.

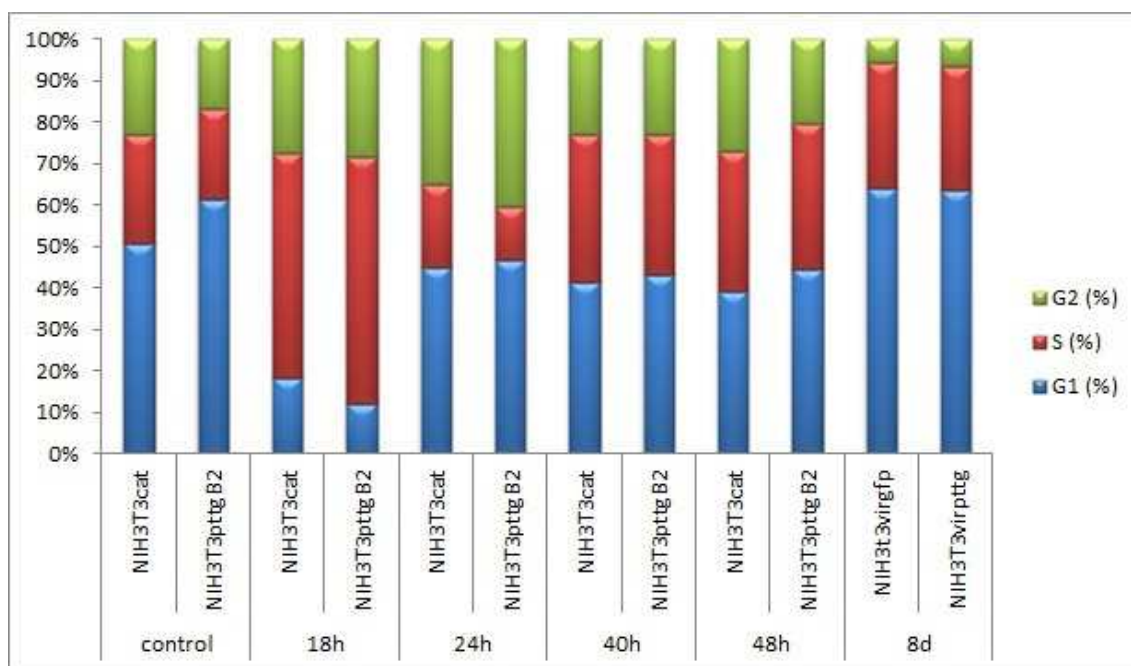


Figura 24. Ciclo celular de la línea NIH3T3 transfectada o infectada con distintas construcciones, expresada de forma transitoria (a distintos tiempos de inducción con IPTG 4mM) y sobreexpresada de forma constitutiva, mediante infección lentiviral.

2.2 Array de PCR en tiempo real

Como se muestra en la figura 25 se realizó un array de PCR en tiempo real (*Superarray*). Se estudiaron 85 genes de quimioquinas y sus receptores, confirmando que *pttg1* presentaba capacidad para modular genes involucrados en señalización celular, mostrando un incremento de los niveles de CXCL12 (9,96 veces) y CCL2 (3,5 veces), así como la modulación de otras citoquinas.

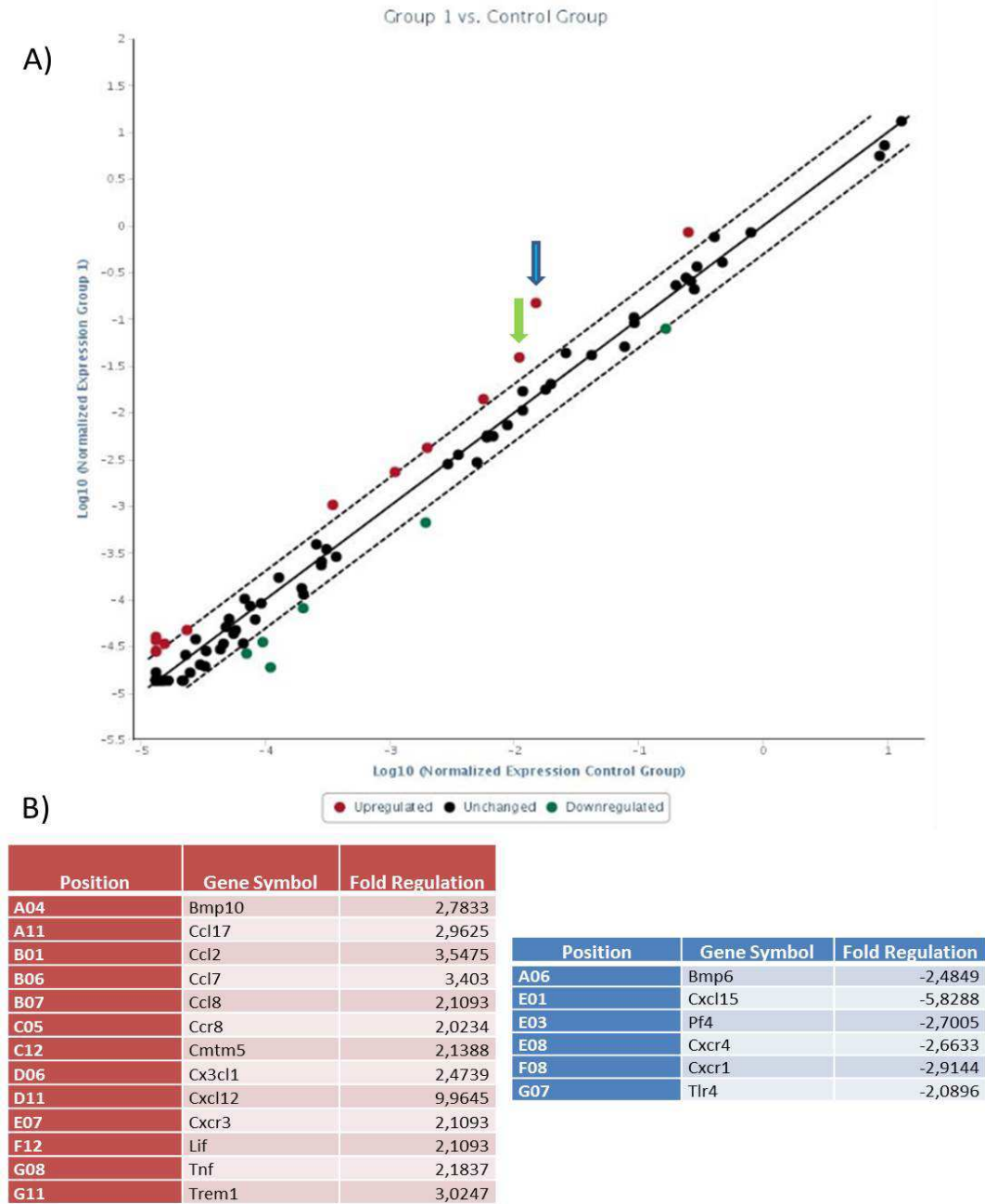
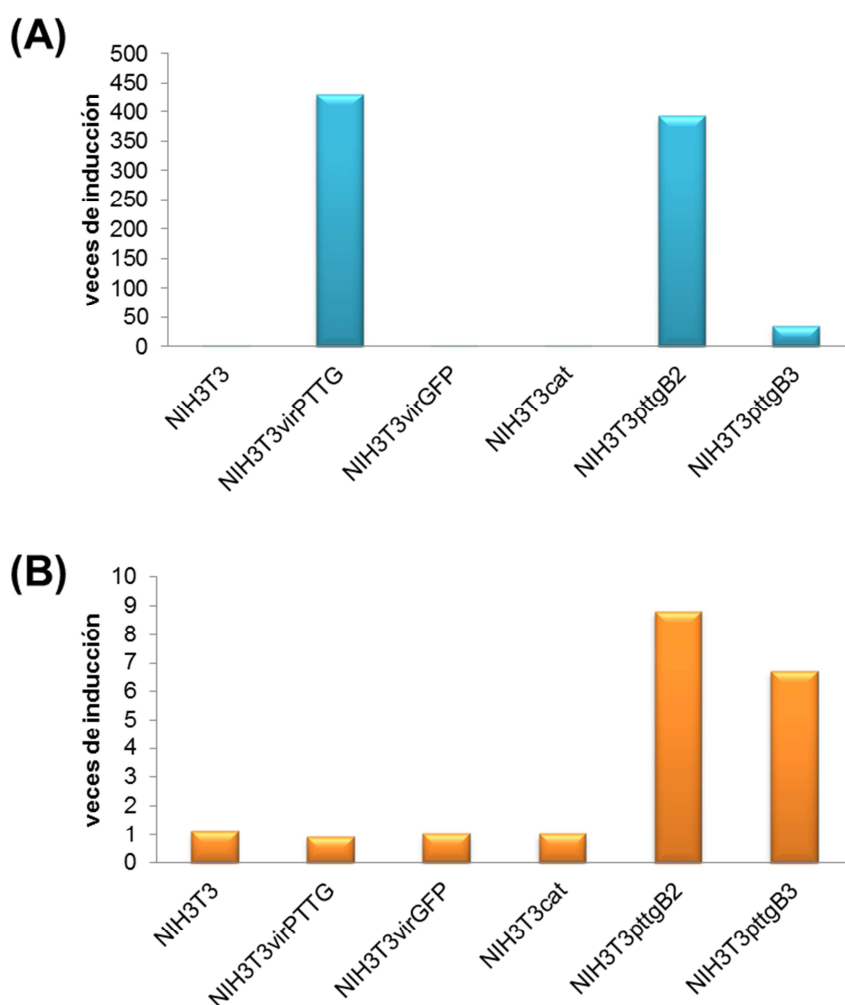


Figura 25. Array de PCR en tiempo real de citoquinas y quimioquinas. (A) Niveles diferenciales de expresión de citoquinas en las células NIH3T3pttgB2 (grupo 1) respecto a NIH3T3cat (grupo control). (B) destaca aquellas citoquinas que aumentan su expresión (tabla roja) y las que disminuyen (tabla azul).

2.3 PCR en tiempo real

Para poder comparar los distintos tipos de líneas estables NIH3T3 obtenidos, se empleó la técnica de PCR en tiempo real haciendo uso de sondas Taqman específicas para los genes *pttg1*, *mcp1* y *sdf1 α* . En la figura 26, se muestran los niveles de expresión de estos genes en las distintas líneas, normalizados cada sistema con respecto a su control. La inducción transitoria del gen *pttg1* con IPTG, en las líneas NIH3T3pttgB2 y NIH3T3pttgB3 aumenta los niveles de expresión de los genes *mcp1* y *sdf1 α* .

En la figura 27, observamos la inducción del gen *pttg1* tras la adición de doxiciplina durante 24h, la expresión de los genes, *mcp1* y *sdf1-alpha*, no sufre inducción bajo dichas condiciones. Al comparar los niveles de *pttg1* en este sistema, observamos que la inducción de nuestro gen es inferior incluso al clon NIH3T3pttgB3 (9 veces de inducción).



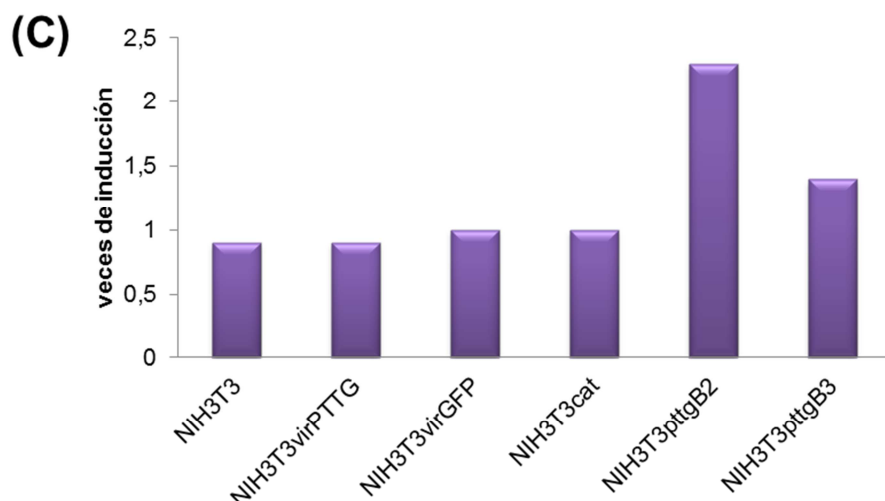


Figura 26. Niveles de RNA mensajero en las distintas construcciones de NIH3T3 mediante PCR tiempo real. (A) Niveles de mRNA *pttg1* (B) Niveles de mRNA *desdf1α*, y (C) Niveles de mRNA *mcp1*.

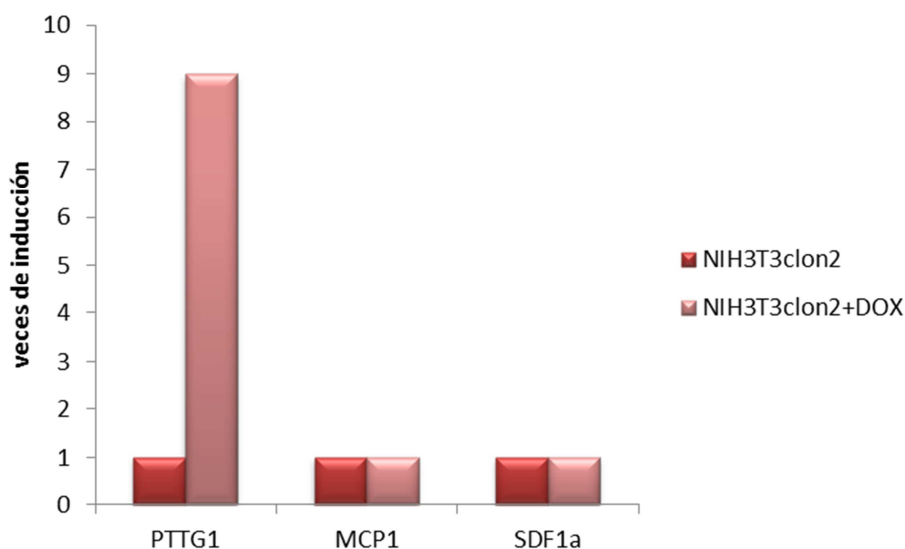


Figura 27. Niveles de mRNA detectados mediante PCR tiempo real de *pttg1*, *mcp1* y *sdf1α* en el sistema inducible tet-on tras la inducción con doxiciplina durante 24h.

2.4 Análisis proteico de PTTG1

Para determinar la correlación entre los niveles de inducción de PTTG1 y la secreción de proteína de MCP1 y SDF1α, se realizaron ensayos de western blot. Los datos de la figura 28, revelaron niveles de PTTG1 en nuestro control (NIH3T3cat) similares a la línea silvestre (wt), para el clon NIH3T3pttgB3 se muestra una inducción media y un aumento mucho más acusado en

el clon NIH3T3pttgB2. Respecto a las líneas infectadas con lentivirus, virPTTG1 y virGFP, la inducción de PTTG1 es muy elevada respecto a su control GFP.

Los niveles de inducción de MCP-1 fueron más altos en las células NIH3T3pttgB2 y no se detectaron en la línea NIH3T3pttgB3 respecto a su control NIH3T3cat. En las líneas infectadas con lentivirus, apreciamos como los niveles en la línea control NIH3T3virGFP son más elevados que en el silvestre. Los niveles de MCP1 en NIH3T3virPTTG1 presentaban inicialmente una inducción, que se pierde con el tiempo, al estabilizar la línea celular. Del mismo modo que para MCP1, se empleó esta técnica para detectar los niveles de SDF1 α haciendo uso de diferentes anticuerpos, pero no se alcanzó a detectar dicha proteína mediante *western blot*.

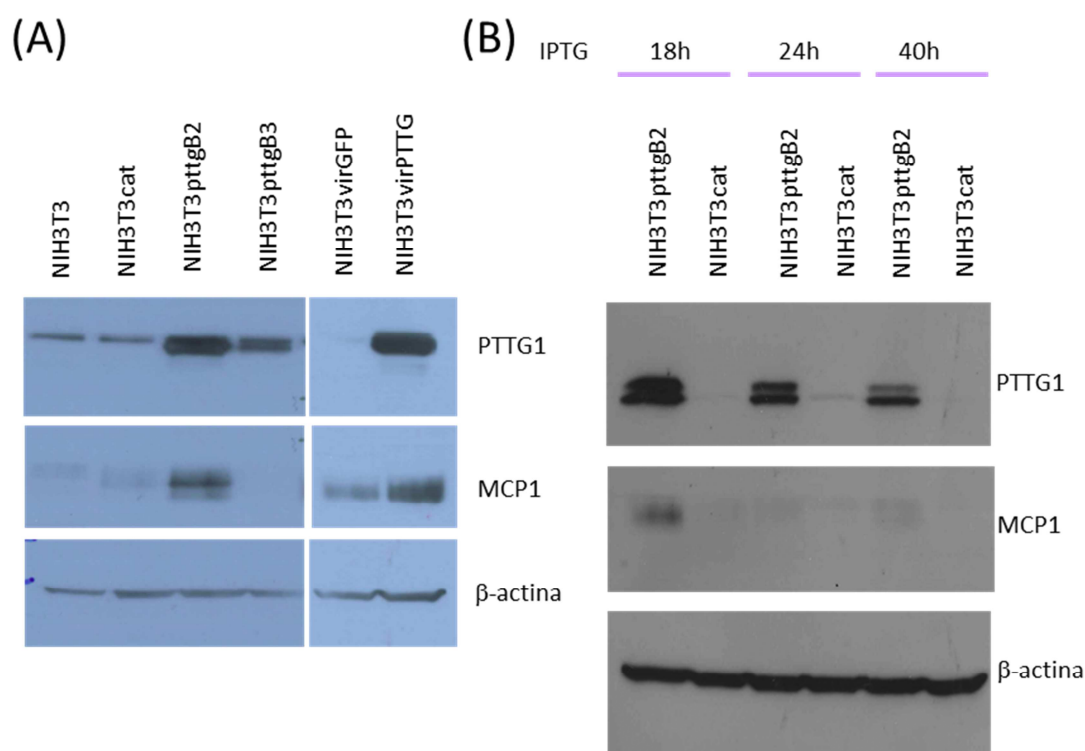


Figura 28. (A) Niveles de proteína PTTG1 en los distintos sistemas de sobreexpresión NIH3T3. Comparación de los niveles de PTTG1 en el sistema inducible por IPTG (18h de inducción) y sistema lentiviral (2 meses de infección). En la parte central, se muestra los niveles de MCP1 en los diferentes sistemas de sobreexpresión. (B) Cinética de los niveles de expresión de PTTG1 y MCP1 tras la inducción con IPTG a 18, 24 y 40h post-inducción.

2.5 Array de proteínas citoquinas

Para analizar de forma simultánea el nivel de expresión de distintas citoquinas bajo condiciones de inducción del gen *pttg1*, se utilizó un array de anticuerpos de citoquinas en membrana, que permitía determinar variaciones en los niveles de 62 citoquinas.

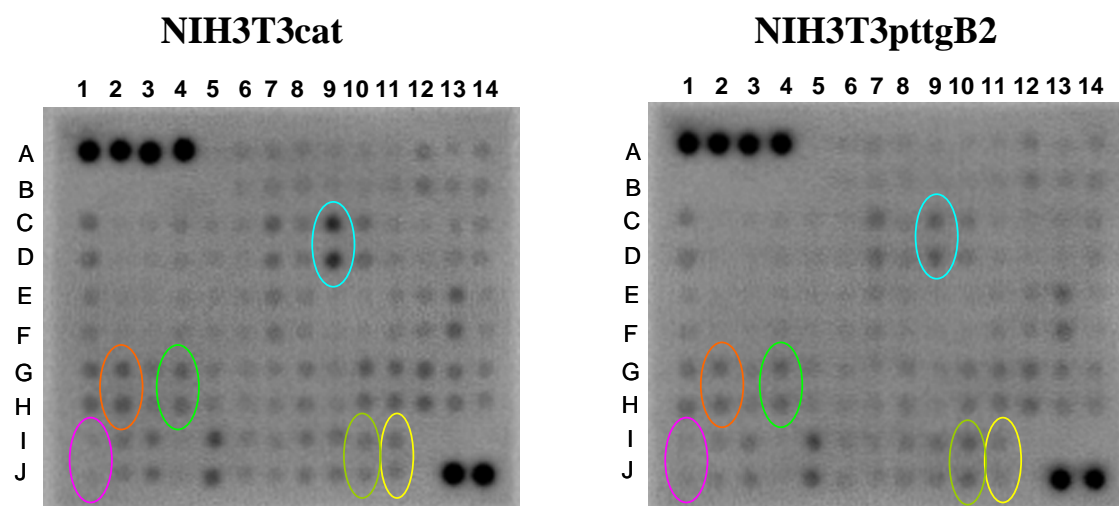


Figura 29. Array de quimioquinas y citoquinas. Células tratadas con IPTG 4mM durante 18h. Cada muestra aparece por duplicado. En la esquina superior izquierda e inferior derecha se presentan controles de carga y controles negativos (no señal). 9C y 9B: IGFBP6; 10I y 10J: VCAM1.

El array de proteínas que presentamos en la figura 29, mostró que en condiciones de sobreexpresión de *pttg1*, existe un aumento de la expresión de la molécula de adhesión VCAM1 involucrada en la adherencia de leucocitos al endotelio vascular (señal 10I y 10J). Además se observó un descenso en los niveles de la proteína IGFBP6 (señal 9C y 9D), regulador negativo del factor de crecimiento IGF-II y proteína involucrada en la pérdida de adhesión celular al sustrato. Respecto a los niveles de las proteínas MCP1, SDF1 α y CSF, no se confirmaron los resultados mediante esta técnica probablemente debido a su menor sensibilidad.

2.6 Estudio de secuencias reguladoras del promotor de MCP1

Experimentos anteriores nos han mostrado cómo en condiciones de sobreexpresión del gen *pttg1*, se produce un incremento en los niveles de RNAm de la citoquina quimiotáctica *mcp1*.

Por ello realizamos ensayos de transactivación de *mcp1*, mediante el uso de las construcciones *pluc 2.8/5*, *pluc 2.8/2*, *pluc 0,5/5* y *pCMV-RL* (renila), en la línea celular NIH3T3cat y NIH3T3pttgB2. La figura 30, muestra que la construcción 2.8/5, que contiene cinco regiones reguladoras, y presenta niveles más elevados de actividad luciferasa en la línea NIH3T3pttgB2 respecto a su control.

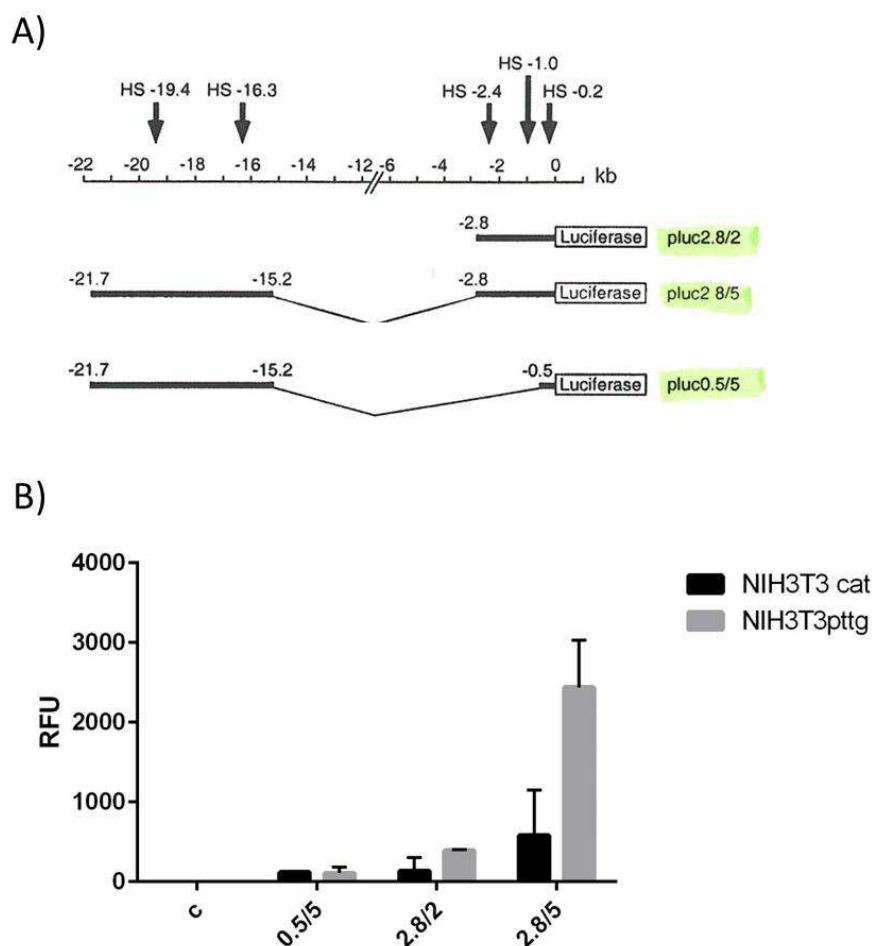


Figura 30. (A) Regiones reguladoras más relevantes del promotor de *mcp1*. (B) Niveles de actividad luciferasa transfectando los distintos plásmidos sobre líneas NIH3T3cat/NIH3T3pttgB2 en condiciones de inducción con IPTG.

3. Estudio de la capacidad migratoria e invasiva de células inmortalizadas que sobreexpresan PTTG1.

Los resultados obtenidos en los apartados anteriores, tanto de modulación de citoquinas como la modificación de familias génicas relacionadas con adhesión focal y ECM, nos llevaron a plantearnos la importancia de realizar ensayos de migración y tracking bajo las condiciones de sobreexpresión del gen pttg. Este estudio nos permitió observar el comportamiento celular en tiempo real, monitorizando la migración colectiva a través de un frente de avance (herida) y la migración individual haciendo un seguimiento de la trayectoria para cada célula (tracking).

Para ello diseñamos ensayos de “wound healing” con las líneas NIH3T3cat y NIH3T3pttgB2 inducidas con IPTG en condiciones de reducción de suero (1%NCS), realizando heridas sobre cultivos celulares crecidos en placas con fondo de vidrio y monitorizando estos cultivos durante 24 o 48h con un microscopio invertido con cámara de cultivo (Cell Observer).

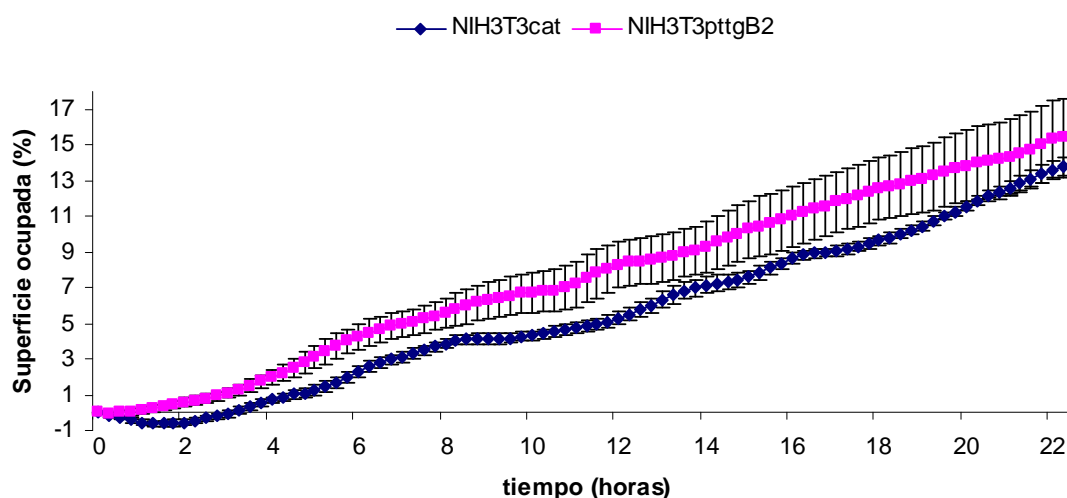


Figura 31. Ensayo de migración de las células NIH3T3cat y NIH3T3pttgB2. Tras realizar una herida en la placa de cultivo, las células fueron monitorizadas por un equipo de time-lapse durante 22h.

Los ensayos de herida se analizaron mediante el programa Metamorph y determinando la capacidad de migración para cada condición y posición. Bajo estos niveles de restricción de suero, el frente de avance se desplaza con extrema lentitud y permitiendo mostrar las diferencias debidas a la

sobreexpresión del gen, obteniendo un ligero aumento en la migración del frente de avance formado por células que sobreexpresan PTTG1 (Figura 31).

El movimiento individual de las células se estudió utilizando la aplicación “MTrackJ” (Image J). Como se observa en la Figura 32 (B y D), las trayectorias recorridas por las células NIH3T3pttg son más largas en un mayor número de casos que en el cultivo control NIH3T3cat, de manera independiente a la presencia de suero, confiriéndole una mayor capacidad para separarse del frente de avance y emprender una trayectoria individual.

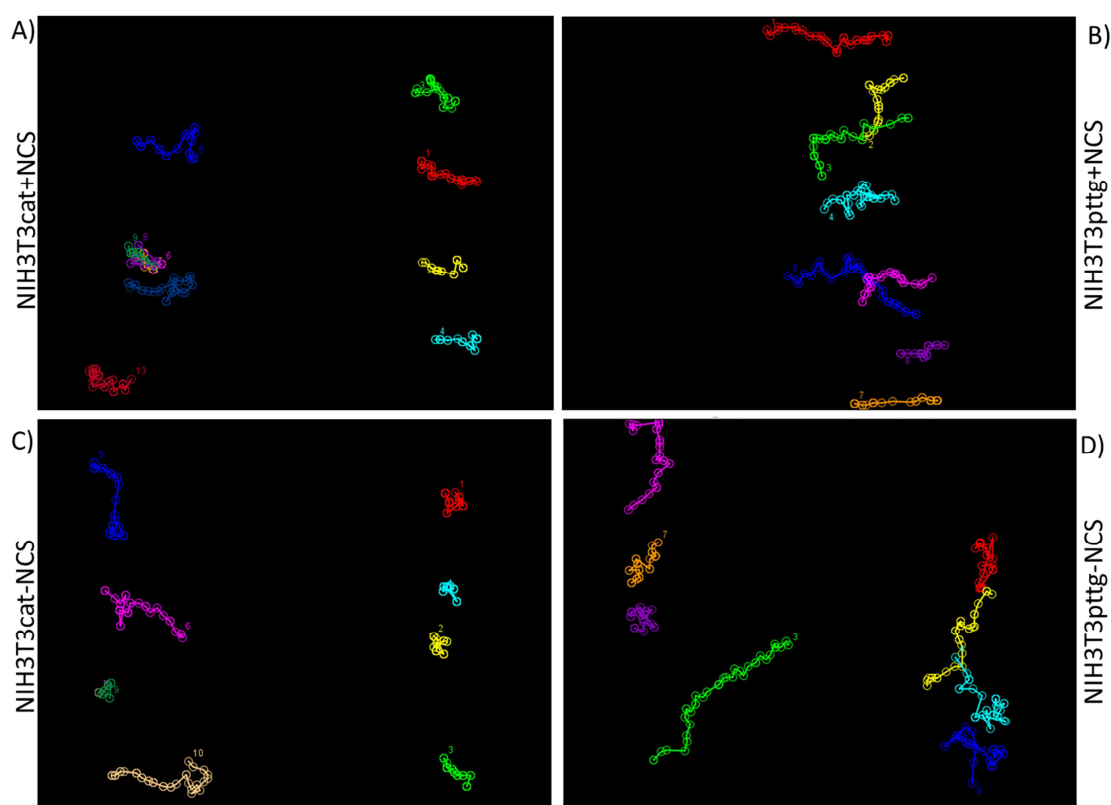


Figura 32. Análisis de la trayectoria individual de células elegidas al azar en las líneas NIH3T3cat (A y C) y NIH3T3pttg (B y D), inducidas con IPTG en condiciones normales (10%) y reducidas de suero (NCS) (1%), mediante la aplicación MTrackJ del software Image J.

Parte II: Determinar la capacidad transactivadora del gen *pttg1* en células humanas y estudio su posible implicación biológica.

1. Caracterización de los sistemas de sobreexpresión e interferencia en células humanas.

En una segunda aproximación se amplió el estudio a un modelo de células humanas (sistema homólogo) sobre las líneas MCF10a, línea celular inmortalizada de mama, MCF7, línea de adenocarcinoma de mama y HCT116, línea de adenocarcinoma de colon.

Mediante el uso de lentivirus, se generaron líneas estables de sobreexpresión e interferencia del gen *pttg1*. La eficiencia de infección lentiviral obtenida para cada tipo celular y condición de sobreexpresión o interferencia, se determinó mediante citometría de flujo, cuantificando el % de células GFP positivas para cada condición.

En la línea celular HCT116 (adenocarcinoma de colon), el porcentaje de células infectadas con el vector lentiviral control y con el vector lentiviral que portaba el gen *pttg1* fue del 82%, y del 72% respectivamente.

En las células inmortalizadas de mama MCF10a, el porcentaje de células infectadas con el vector lentiviral control fue del 74%, y del 78% con el vector lentiviral que contenía el gen *pttg1*. El porcentaje de células infectadas con la construcción interferente del gen *pttg1* fue del 76,3%.

En la línea celular MCF7luc, que expresa constitutivamente el gen luciferasa, las eficiencias de infección fueron del 72%, 80% y 83% con los vectores lentivirales control, de sobreexpresión de *pttg1* e interferencia de *pttg1* respectivamente. Los perfiles de estos histogramas aparecen representados en la figura 33.

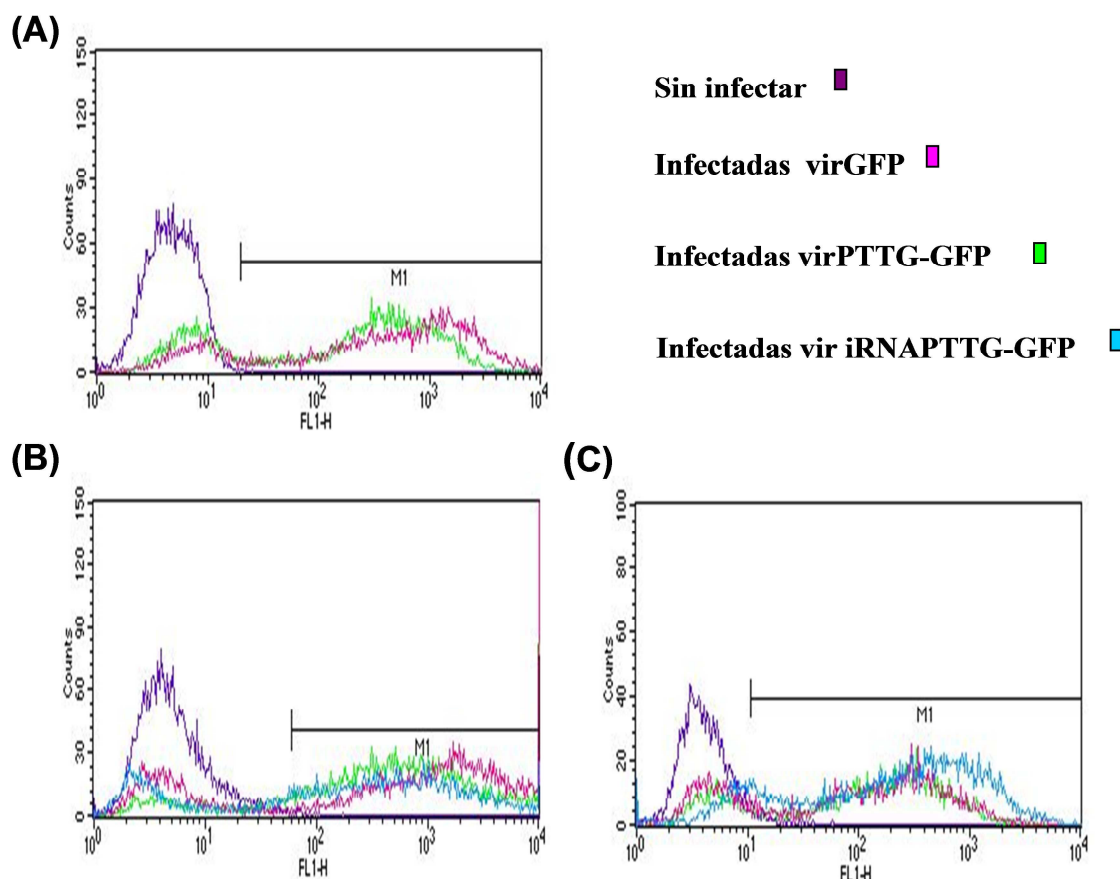


Figura 33. Líneas estables de sobreexpresión e interferencia de *pttg1*. (A) Población de células HCT116 positiva para GFP (M1), infectadas con lentivirus control (virGFP) o lentivirus que contienen el cDNA Pttg1 (virPTTG-GFP). (B) Población de células MCF10a positiva para GFP (M1) infectadas bien con virGFP, virPTTG-GFP o lentivirus que contienen un oligonucleótido de interferencia contra Pttg1 (iRNAPTTG-GFP). (C) Población de células MCF7 positiva para GFP (M1) infectadas con los tipos de lentivirus mencionados anteriormente.

Además, las líneas obtenidas se caracterizaron a nivel transcripcional y traduccional, realizándose ensayos de PCR tiempo real, con sondas específicas del gen *pttg1* y el gen de expresión constitutiva *hprt1* como control. Mediante esta técnica se determinó el nivel de inducción o represión de RNAm Pttg1 en las distintas líneas celulares generadas (Figura 34).

A nivel traduccional se determinaron, mediante western blot, los niveles de PTTG1 en las distintas líneas humanas producidas, normalizando con respecto a valores de la proteína endógena β -actina como control interno de carga (Figura 35).

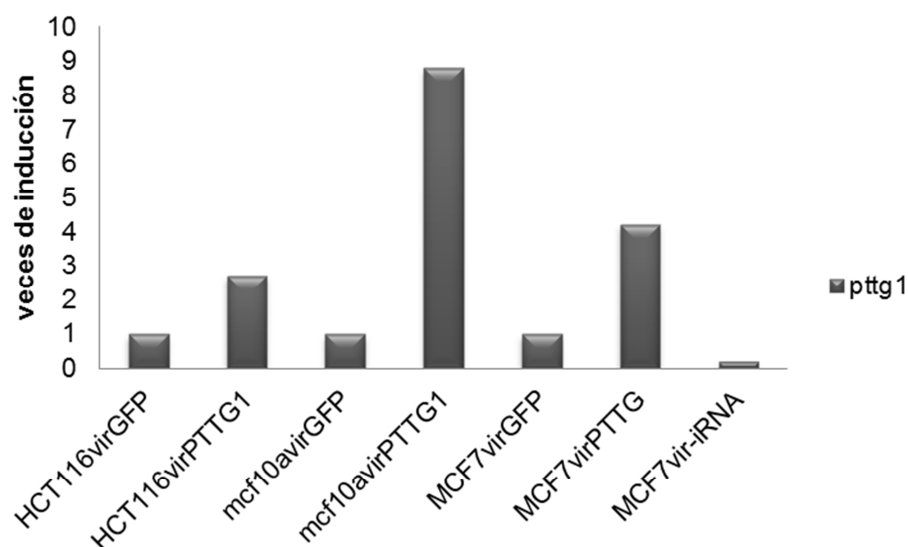


Figura 34. Niveles de RNAm Pttg1 en las distintas líneas celulares generadas. Niveles de RNAm Pttg1 en la línea celular HCT116virPTTG1 *versus* HCT116virGFP, en la línea celular MCF10avirPTTG1 *versus* MCF10avirGFP y en la líneas celulares MCF7vir-iRNA-PTTG1 y MCF7virPTTG1 *versus* MCF7virGFP.

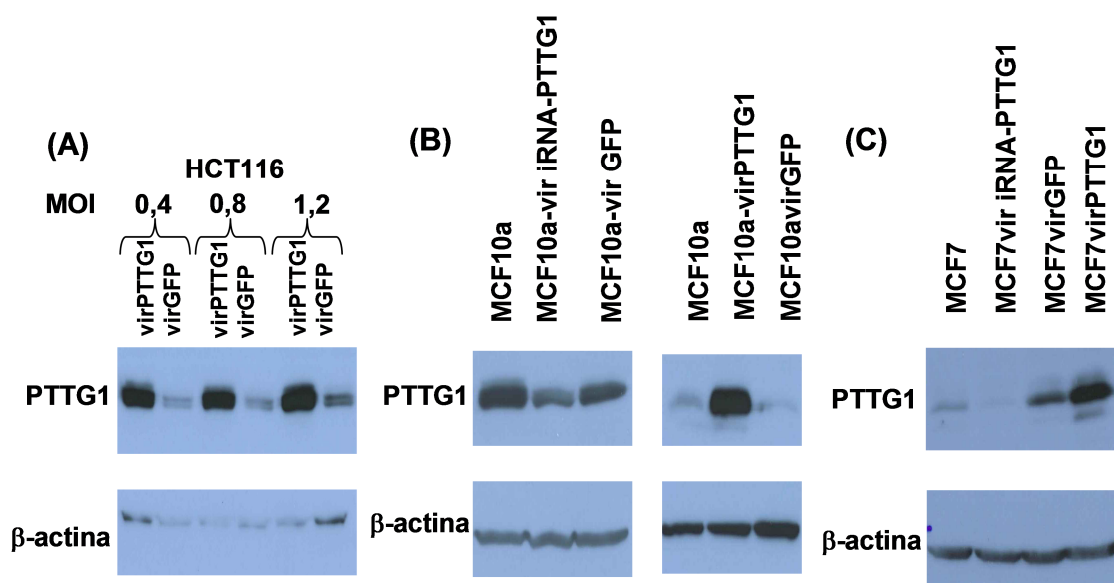


Figura 35. Análisis de la expresión de la proteína PTTG1. (A) Niveles de expresión de PTTG1 en la línea HCT116 a distintas MOI de infección. (B) línea MCF10A en condiciones de interferencia (aumentando la carga de proteína para detectar las diferencias de expresión) y sobreexpresión de PTTG1. (C) línea MCF7 en las condiciones anteriormente mencionadas de sobreexpresión e interferencia.

2. Estudio de la capacidad transactivadora del gen *pttg1* en células humanas.

Según los resultados anteriormente obtenidos, la sobreexpresión del gen *pttg1* en fibroblastos de ratón, afecta a los niveles de expresión de ciertas quimioquinas, por ello decidimos analizar el efecto de *pttg1* sobre distintas líneas celulares humanas previamente caracterizadas. Determinamos los niveles de RNAm de *Mcp1* y de *Sdf1 α* mediante PCR tiempo real con sondas Taqman. Como se aprecia en la figura 36, se detectó un incremento de los niveles de *Mcp1* en HCT116virPTTG1 versus HCT116virGFP. En la línea celular MCF10a, MCF10avirPTTG1 y su control MCF10avirGFP los niveles de expresión de ambas citoquinas fueron indetectables por PCR tiempo real. En las líneas MCF7luc virGFP, MCF7luc virPTTG1 no se detectaron valores de expresión de *Mcp1*; pero sí de *Sdf1 α* cuyos niveles aumentaban 4 veces al sobreexpresar PTTG1, como se aprecia en la figura 36B.

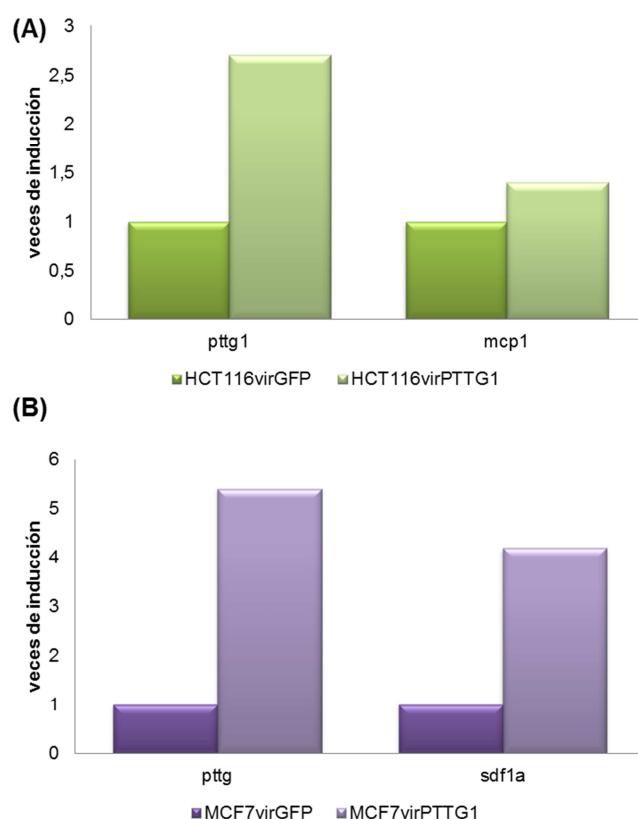


Figura 36. (A) Análisis de los niveles de RNAm de MCP1 mediante PCR real-time en la línea HCT116 sobreexpresando PTTG1 (HCT116virPTTG1) y en la línea control (HCT116virGFP). (B) Niveles de RNAm de SDF1 en las líneas MCF7luc virGFP y MCF7luc virPTTG1-GFP.

3. Estudio del fenotipo de la modulación del gen *pttg1* en la línea celular MCF7

Tras haber obtenido la línea celular MCF7luc establemente transfectada con la construcción lentiviral pSINdualGFP-iRNApttg1 (MCF7luc-viriRNA-PTTG1), observamos diferencias fenotípicas en el examen *de visu* que se realizaba diariamente a los cultivos bajo el microscopio invertido, en comparación con la línea control. Este fenotipo consistía en una tasa de crecimiento más baja y un elevado número de células que perdían el anclaje al sustrato y permanecían flotando en el sobrenadante del cultivo. La disminución en los niveles de la proteína PTTG1, parecía afectar de alguna manera a su supervivencia y a su adhesión; este efecto, no fue observado en las líneas control MCF7luc y MCF7luc-virGFP, ni en la línea MCF7luc-virPTTG1, que sobreexpresa el gen *pttg1* (Figura 37).

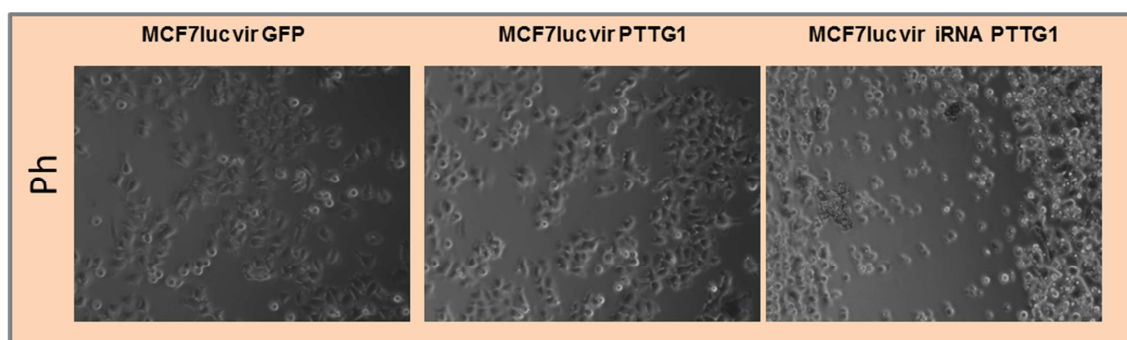


Figura 37. Imagen de microscopio invertido donde se muestra el fenotipo de crecimiento en placa, para las líneas MCF7luc virGFP, MCF7luc vir PTTG1 y MCF7luc vir iRNA PTTG1. Las células control y la sobreexpresión de PTTG1 presentaban una morfología y adhesión al sustrato normales.

Para determinar diferencias en el crecimiento celular aplicamos un protocolo de cuantificación mediante tinción con sulforrodamina B. En la figura 38, mostramos una imagen de las células que permanecían adheridas al sustrato teñidas con sulforrodamina. En el apartado B de esta figura, se presentan los datos obtenidos a partir de estos ensayos, donde observamos una reducción en la tasa de proliferación de MCF7luc-viriRNA-PTTG1 del 75% con respecto a la línea control, para la condición de sobreexpresión de PTTG1, no se observan diferencias en el crecimiento.

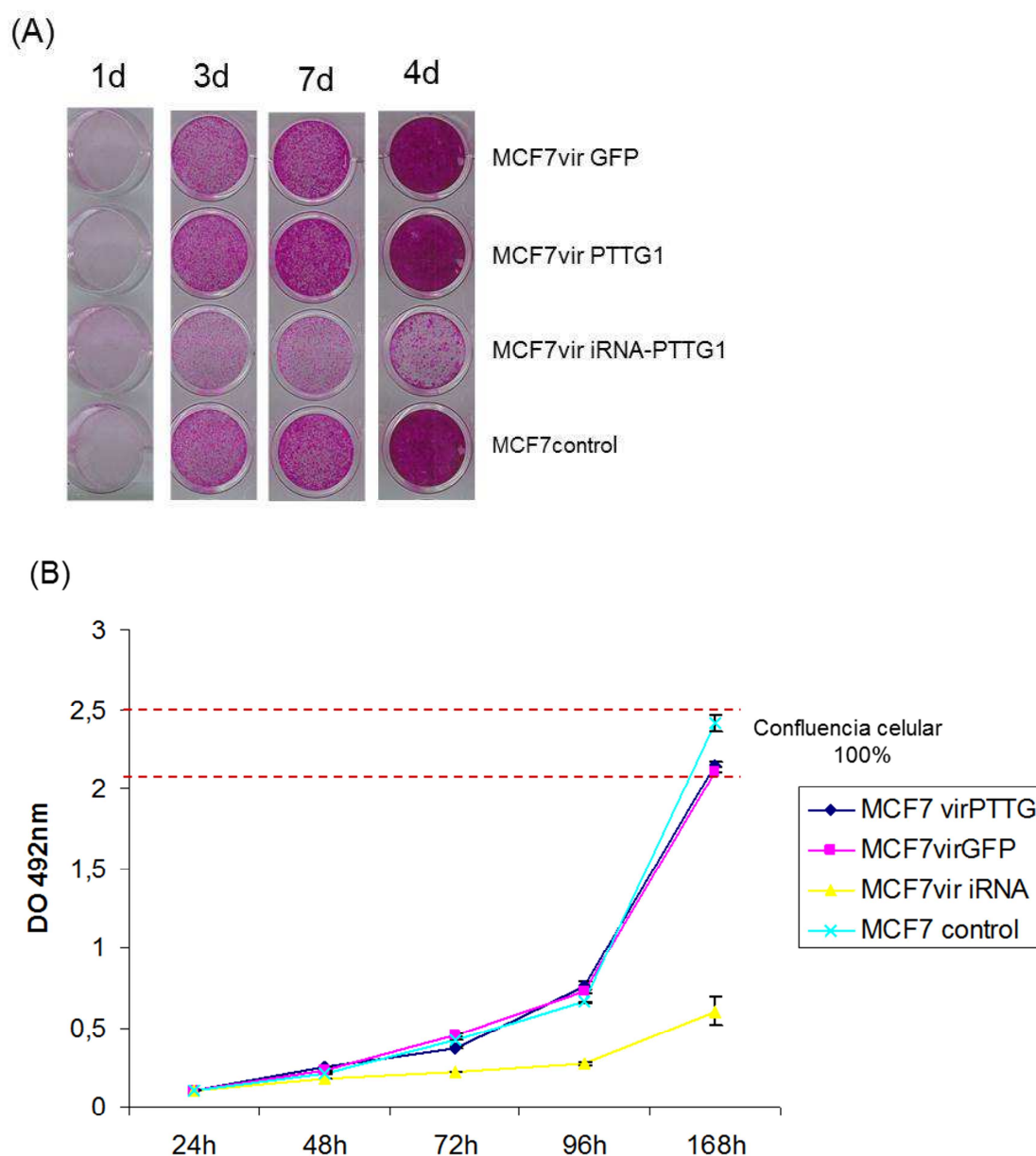


Figura 38. (A) Tinción de las células con Sulforrodamina. (B) Efecto de la interferencia del gen *pttg1* en la proliferación celular. La línea celular MCF7 fue infectada con virus control, sobreexpresión de PTTG1 e interferencia de PTTG1. La cinética de tiempo se realizó a 24, 48, 72, 96 y 168 horas y se cuantificó espectrofotométricamente a DO 492nm.

El análisis de ciclo celular en estas líneas, mostró un aumento de la fase Go-G1 entorno al 13% para MCF7luc-viriRNA-PTTG1 respecto a los controles, con la correspondiente disminución de las fases S y G2 (figura 39).

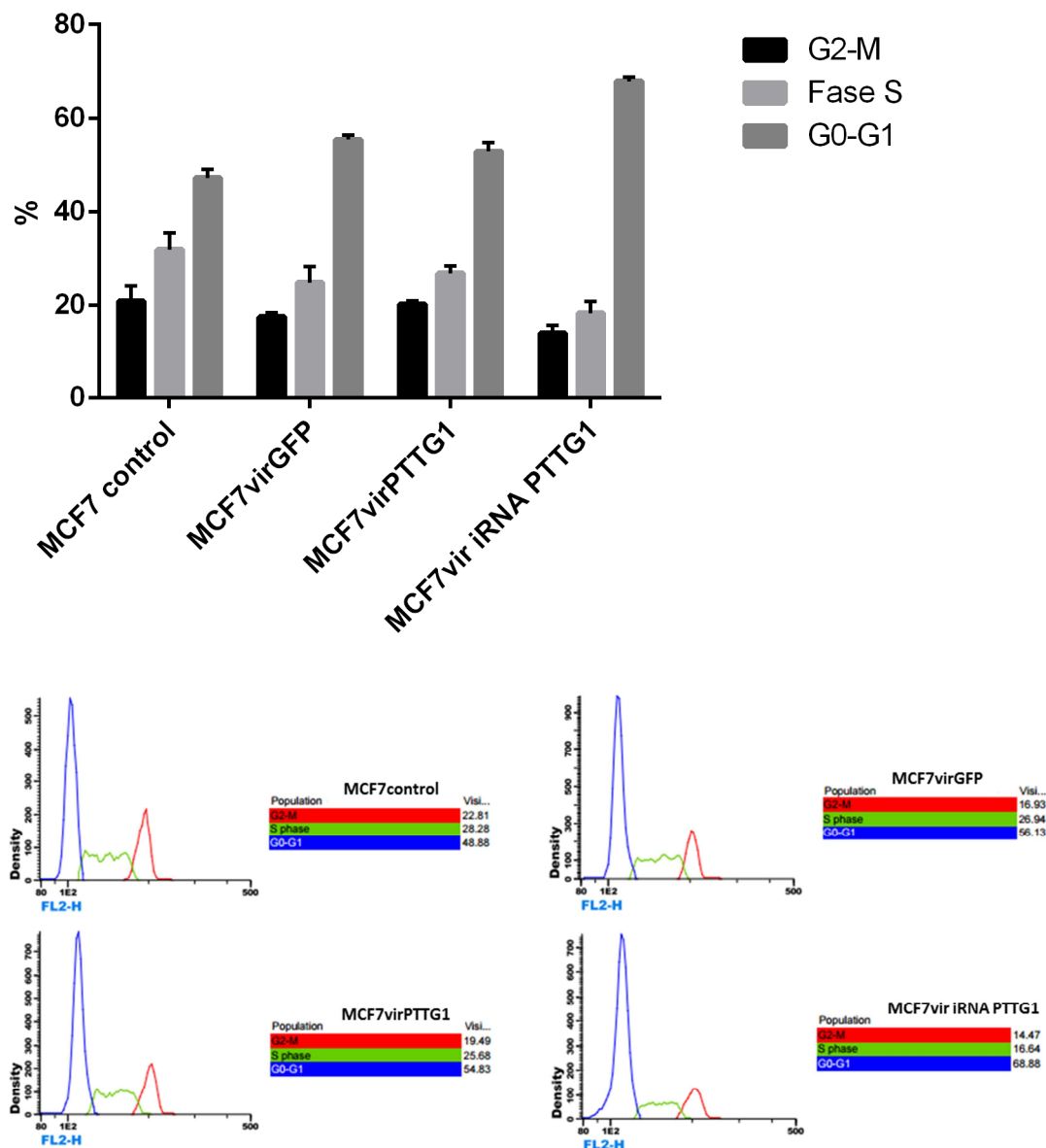


Figura 39. Diferencias en el ciclo celular en condiciones de interferencia del gen *pttg1*. Observamos un ciclo celular normal para las condiciones de sobreexpresión del gen *pttg1* con respecto a las condiciones control y un aumento de las fases subG1 en las muestras interferidas para este gen.

Debido al elevado número de células despegadas del sustrato que aparecían flotando en el medio de cultivo de la línea celular MCF7luc vir iRNA PTTG1, tratamos de determinar en qué condiciones se encontraban estas células. Para ello realizamos una tinción *in vivo* con Yoduro de propidio (IP) y posterior análisis mediante citometría de flujo. La figura 40 presenta el incremento de muerte celular que sufre la línea interferida con el gen *pttg1*, con respecto al resto de condiciones.

Por otro lado, recogimos los sobrenadantes celulares y realizamos medidas de viabilidad, tiñendo con el colorante vital azul tripan y contando el número de células vivas y muertas para cada línea (figura 41). Estos resultados mostraron un gran incremento de células que habían perdido adherencia al sustrato y que más del 50% de las células que perdían adherencia al sustrato seguían estando vivas, para la línea celular MCF7luc vir iRNA PTTG1.

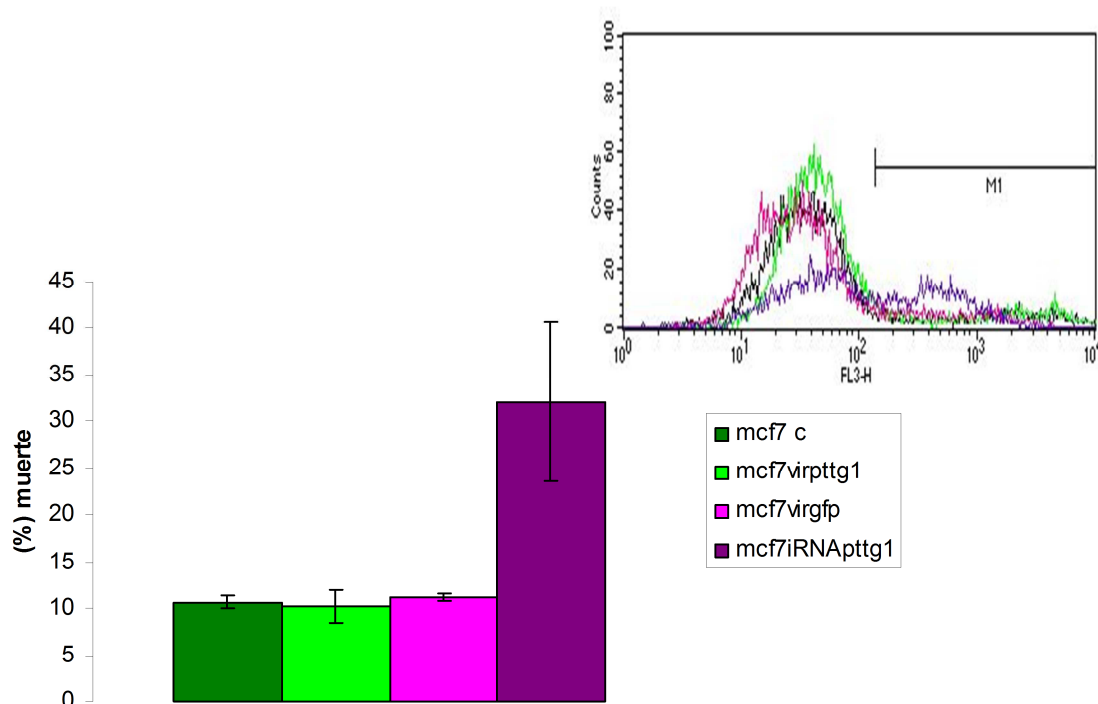


Figura 40. Porcentaje de muerte celular mediante tinción *in vivo* con IP. En la parte izquierda se muestra mediante una representación gráfica, los valores (%) de muerte celular observados mediante citometría de flujo. En la parte derecha mostramos el diagrama obtenido al analizar las muestras.

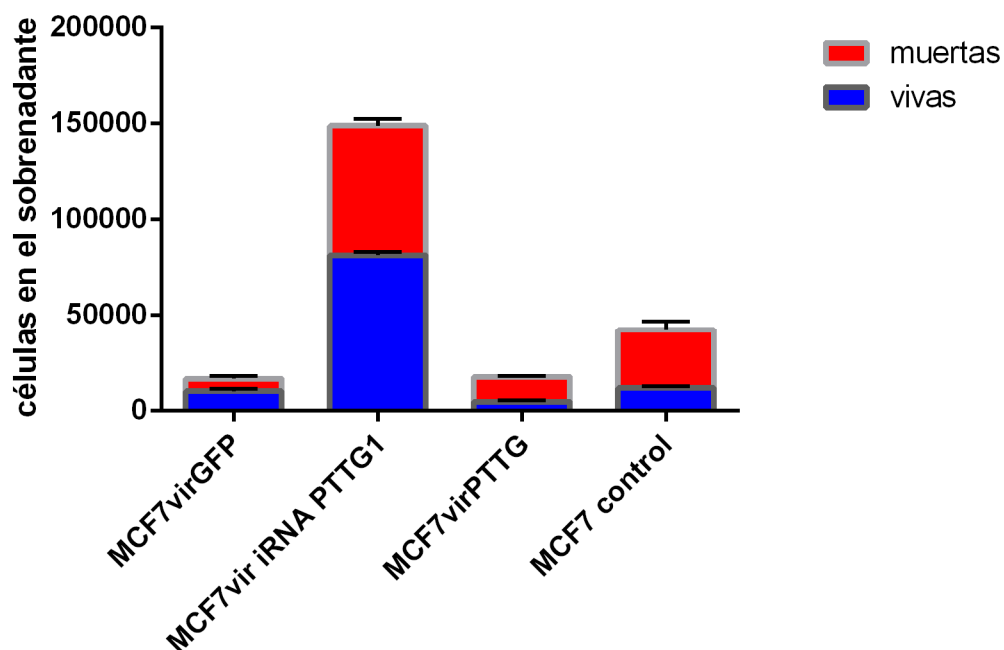


Figura 41. Número de células total que se despegan del sustrato y aparecen flotando en el medio de cultivo celular (tinción azul tripan). La línea MCF7vir iRNA PTTG1 presenta el mayor número de células que se despegan del sustrato, tal y como se observa en la gráfica.

La pérdida de anclaje al sustrato observada en las células interferidas para el gen *pttg1* fue monitorizada mediante un equipo de time-lapse en el que pudimos realizar un seguimiento *in vivo* del crecimiento de células MCF7 inicialmente vivas y adheridas al sustrato, y comprobar a lo largo de 72h, como variaban su morfología, perdían su anclaje al sustrato y pasaban a disponerse en el medio de cultivo o simplemente desaparecer (figura 42).

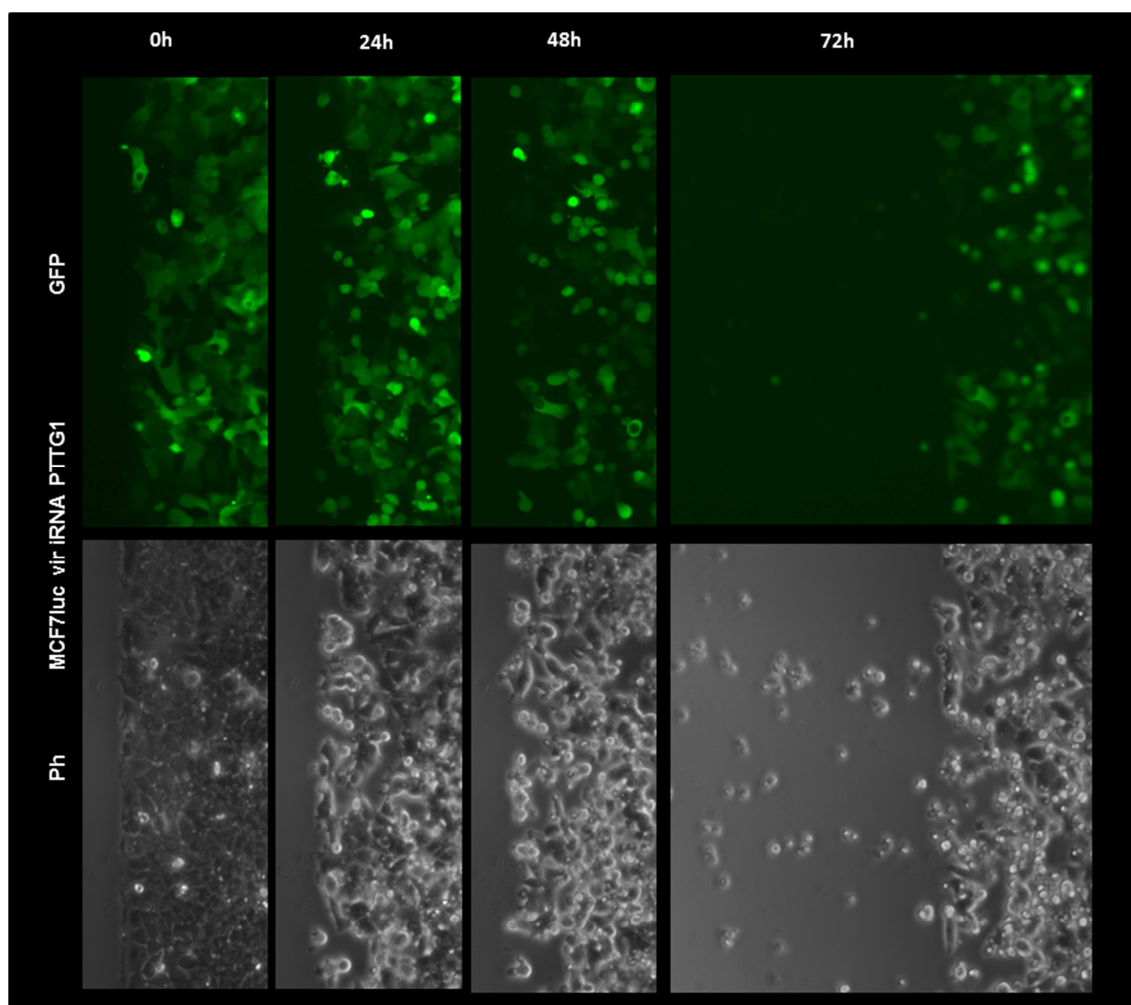


Figura 42. La interferencia del gen *pttg1* ocasiona pérdida de anclaje al sustrato en la línea celular MCF7. Mediante time-lapse se realizó un seguimiento *in vivo* durante 72 de la línea interferida para dicho gen (MCF7vir iRNA). Transcurridas 72h se aprecian cambios morfológicos.

Para medir apoptosis realizamos un marcaje con anexina V, que nos permitiría detectar células GFP positivas apoptóticas. Mediante citometría de flujo y con ayuda del software Infinicyt, analizamos el marcaje con anexina V, de muestras procedentes de una cinética de crecimiento celular de 24, 48 y 72h tras la siembra en placa. En la figura 43 podemos observar como la línea interferida alcanza hasta un 18% más de células anexina V positivas tras 72h de cultivo.

Mediante ensayos de western blot mostrados en la figura 44, determinamos los niveles del receptor de muerte celular Fas en todas las condiciones de inducción y represión de PTTG1, apreciándose un incremento de la señal en la línea MCF7 interferida para *pttg1*.

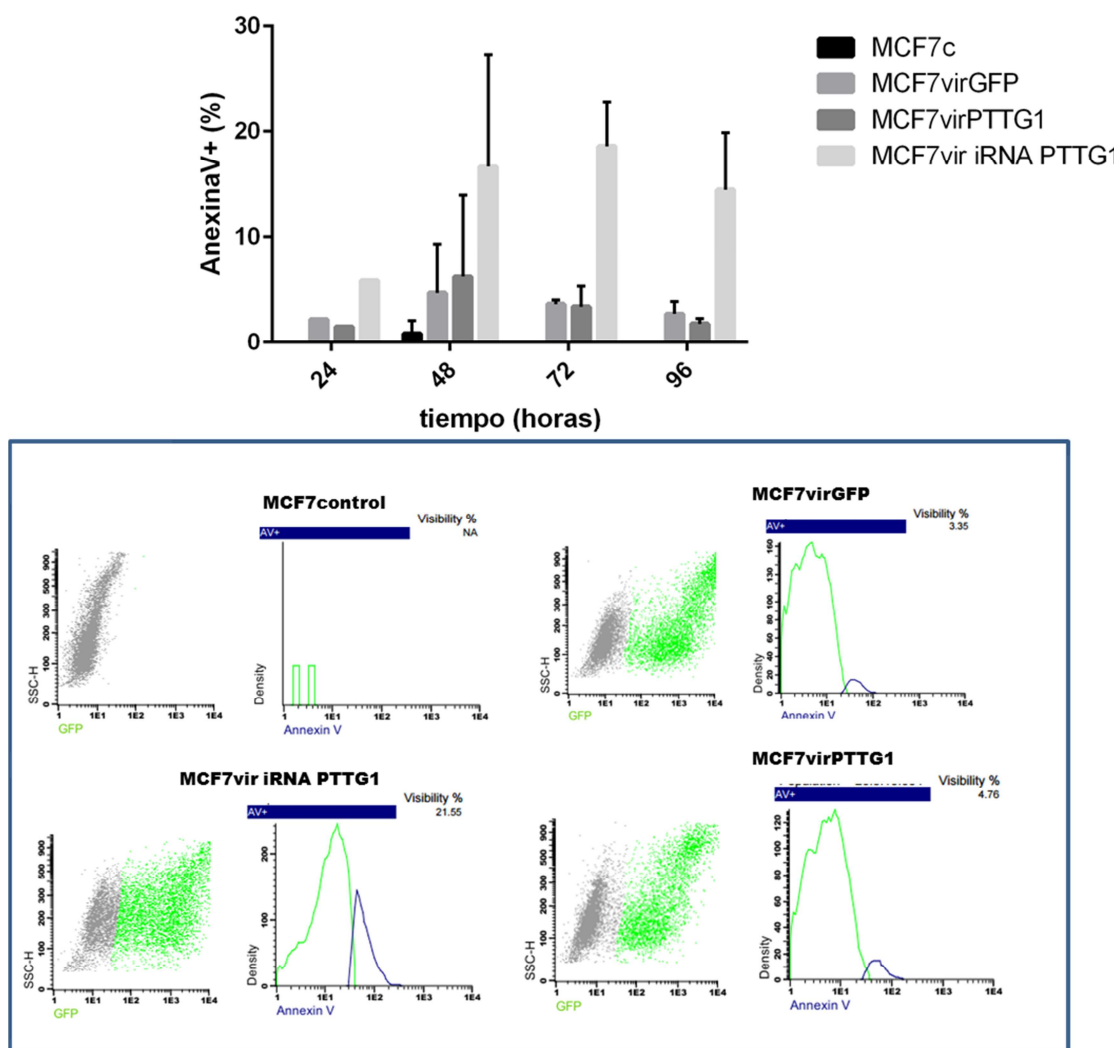


Figura 43. Apoptosis inducida por la interferencia de *pttg1* en la línea celular MCF7. Citometría de flujo con marcaje anexina v en una cinética de cultivo de 24, 48 y 72h.

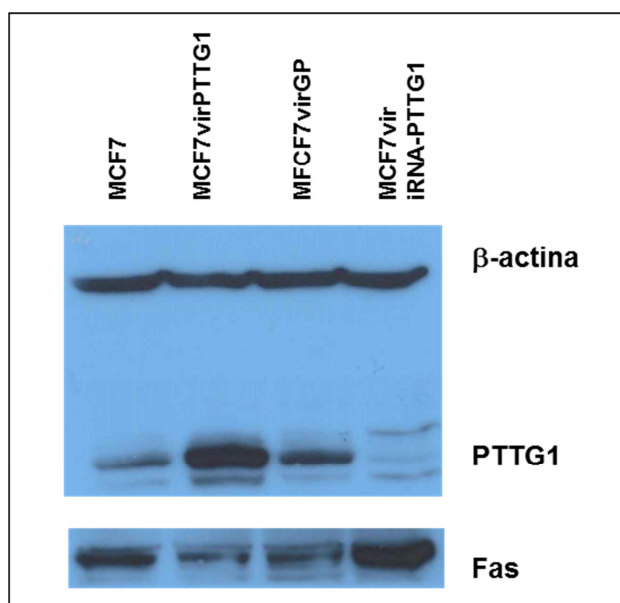


Figura 44. Análisis de la expresión de la proteína PTTG1 y Fas en la línea MCF7 en condiciones de sobreexpresión e interferencia del gen *pttg1*.

4. Estudio de la expresión génica modulación del gen *pttg1* en la línea celular MCF7

Con el fin de analizar los cambios de expresión génica producidos por la sobreexpresión o ausencia de *pttg1*, empleamos RNAm de la línea celular de adenocarcinoma de mama MCF7, para realizar un microarray GeneChip® de Affimetrix, en condiciones tanto de sobreexpresión como de interferencia de PTTG1; estas líneas habían sido previamente caracterizadas, tal y como se presenta en el apartado anterior de esta tesis. Los resultados que mostramos a continuación se obtuvieron analizando los datos obtenidos con la herramienta de enriquecimiento de genes *Enrichr*.

Sobreexpresión de PTTG1 incrementa:

Rutas asociadas a:

Rho GTPase cycle

L1CAM interactions

Signaling by Rho GTPases

Función Biológica asociadas a:

regulation of cell morphogenesis involved in differentiation (GO:0010769)

small GTPase mediated signal transduction (GO:0007264)

regulation of small GTPase mediated signal transduction (GO:0051056)

actin cytoskeleton organization (GO:0030036)

actin filament-based process (GO:0030029)

Sobreexpresión de PTTG1 disminuye:

Rutas asociadas a:

pten dependent cell cycle arrest and apoptosis

igf-1 signaling pathway

Función Biológica asociadas a:

proteolysis involved in cellular protein catabolic process (GO:0051603)

modification-dependent macromolecule catabolic process (GO:0043632)

modification-dependent protein catabolic process (GO:0019941)

ubiquitin-dependent protein catabolic process (GO:0006511)

Figura 45. Array de RNAm en la línea celular de adenocarcinoma de mama MCF7 en condiciones de sobreexpresión del gen *pttg1*. Agrupaciones realizadas procesos biológicos (GO) y en rutas celulares.

La sobreexpresión de PTTG1 en MCF7, induce la regulación de genes de morfogénesis celular relacionada con la diferenciación, la transducción de señales mediadas por pequeñas GTPasas y la regulación del citoesqueleto de actina, además de activar la ruta de las Rho GTPasas. Por otro lado reprime rutas de parada de ciclo y apoptosis y procesos catabólicos de proteínas que precisan ubiquitinización. La interferencia del gen *pttg1* en MCF7, tiene como resultado la activación de genes relacionados con respuesta a virus, activación de rutas apoptóticas y rutas de señalización de Erbb y receptores tipo Toll. Por otro lado, la falta de PTTG1, reprime genes relacionados con procesos migratorios, disminuye la adhesión focal y la interacción con receptores ECM, perjudicando el desarrollo del tumor y favoreciendo una muerte celular programada.

Interferencia de PTTG1 incrementa:

Rutas asociadas a:

toll like receptor signaling pathway

apoptosis

erbb signaling pathway

Función Biológica asociadas a:

response to virus (GO:0009615)

defense response to virus (GO:0051607)

response to other organism (GO:0051707)

cytokine-mediated signaling pathway (GO:0019221)

Interferencia de PTTG1 disminuye:

Rutas asociadas a:

focal adhesion

ecm receptor interaction

Función Biológica asociadas a:

positive regulation of epithelial cell migration (GO:0010634)

regulation of epithelial cell migration (GO:0010632)

regulation of endothelial cell migration (GO:0010594)

positive regulation of endothelial cell migration (GO:0010595)

Figura 46. Array de RNAm en la línea celular de adenocarcinoma de mama MCF7 en condiciones de interferencia del gen *pttg1*. Agrupaciones realizadas procesos biológicos (GO) y en rutas celulares.

Parte III: Estudio del modelo animal de xenotransplante en mama con la línea celular MCF7 en condiciones de sobreexpresión e interferencia de pttg1.

1. Modelos animales: Xenotransplante en mama.

Un objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de la sobreexpresión e interferencia del gen *pttg1* en el desarrollo de tumores de mama. Para ello se llevó a cabo un estudio utilizando xenotransplantes ortotópicos de células de origen mamario con distintos niveles de expresión del gen *pttg1* en el tejido graso de mamas de ratonas atímicas, analizando posteriormente la evolución de los tumores originados.

Se comprobó que la línea MCF7luc generaba tumores en mama pero no metástasis, y que la línea MDA-MB-231luc4175 generaba tumores en mama y posteriormente metástasis en pulmón y nódulos linfáticos. Mediante el uso del Xenogen se determinó la evolución de los tumores, estableciéndose una correlación entre el volumen tumoral y la luminiscencia emitida. Así mismo, se detectaron metástasis en pulmón y ganglios linfáticos pertenecientes a los tumores generados por células MDA-MB-luc4175 (figura 47). Una vez comprobado el correcto diseño de nuestro experimento y la capacidad de detección del equipo Xenogen, procedimos a realizar nuestro estudio.

Debido a que el crecimiento de la línea celular MCF7luc es dependiente de estrógenos, el mismo día del xenotransplante ortotópico, se implantó subcutáneamente a cada ratona, una pastilla de 17β -estradiol, mediante pequeña cirugía. Este tratamiento hormonal tiene una vida media de 90 días. A continuación, se procedió a realizar el trasplante de células MCF7 en el tejido mamario de las ratonas, dando lugar a tres grupos de estudio, MCF7luc-virGFP (control), MCF7luc-virPTTG1 (sobreexpresión) y MCF7luc-vir-iRNAPTTG1 (interferencia), que fueron monitorizados durante un periodo de 15 semanas.

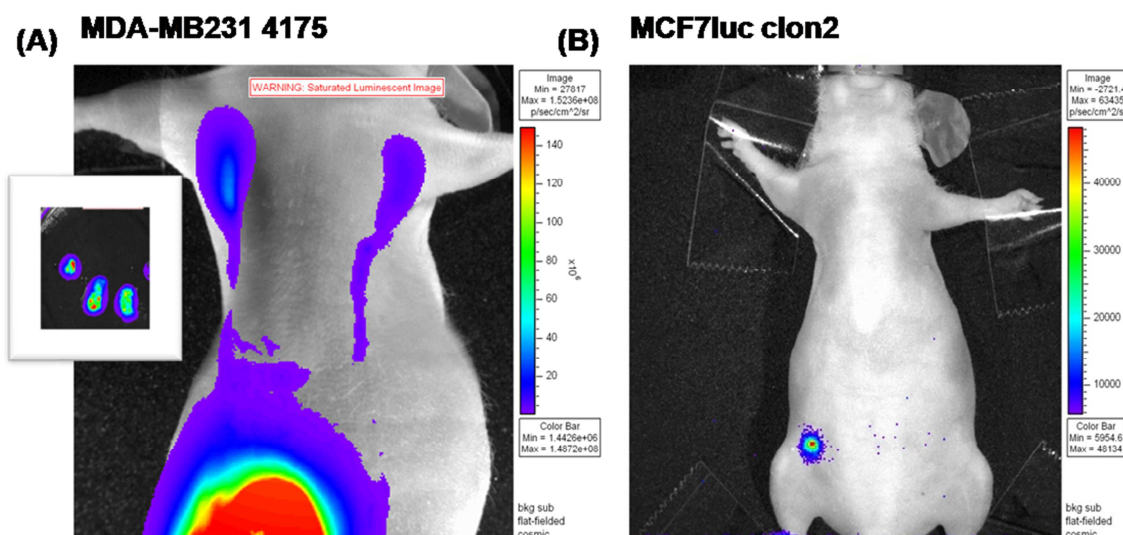


Figura 47. Trasplante ortotópico en mama de líneas MDA-MB231luc (metastásicas) y MCF7luc (no metastásicas). Detección mediante IVIS-50 de la señal de luminiscencia procedente de las líneas MDA-MB-231 4175 (A) y MCF7luc (B), tras 8 semanas desde su xenotransplante ortotópico en ratonas atímicas. En la figura (A) en el recuadro pequeño (izquierda) se muestra la luminiscencia de los órganos que han sufrido metástasis, nódulos linfáticos axilares y pulmón tras biopsia.

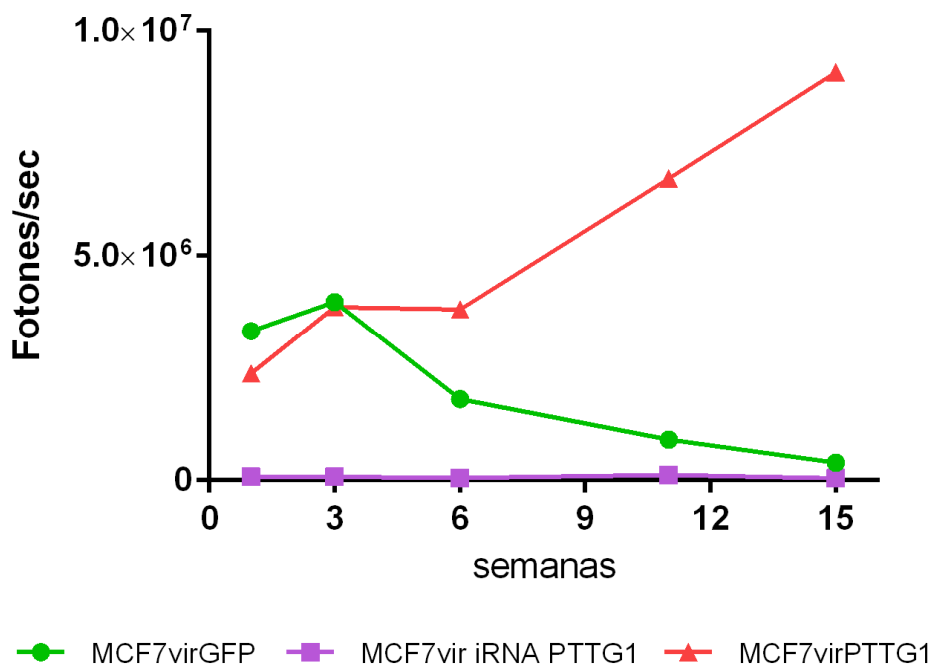


Figura 48. Representación de los valores medios de la señal de luminiscencia obtenida en los trasplantes ortotópicos de mama (n=10) con las líneas MCF7virGFP (control), MCF7vir iRNA PTTG1 y MCF7virPTTG1 con tratamiento hormonal de β -estradiol. El seguimiento de las medidas de luminiscencia (fotones/segundo) se realizó durante un periodo de 15 semanas para descartar la presencia de metástasis.

Como se muestra en la figura 48, las primeras medidas de luminiscencia fueron tomadas 7 días post-trasplante. El seguimiento del ensayo se prolongó durante 15 semanas (105 días), captando imágenes las semanas 1,3, 6,11 y 15. La gráfica nos muestra a partir de la primera semana, un descenso acusado de la luminiscencia en las ratonas inyectadas con células expresando el RNA interferente de *pttg1*. Este descenso se mantuvo en niveles mínimos a lo largo de las 15 semanas de seguimiento, obligándonos a incrementar el tiempo de exposición para detectar su señal. Las ratonas inyectadas con las células control, mostraron una señal de luminiscencia notablemente estable hasta la semana 8, a partir de la cual la luminiscencia empieza a decaer, como apreciamos en la figura 49.

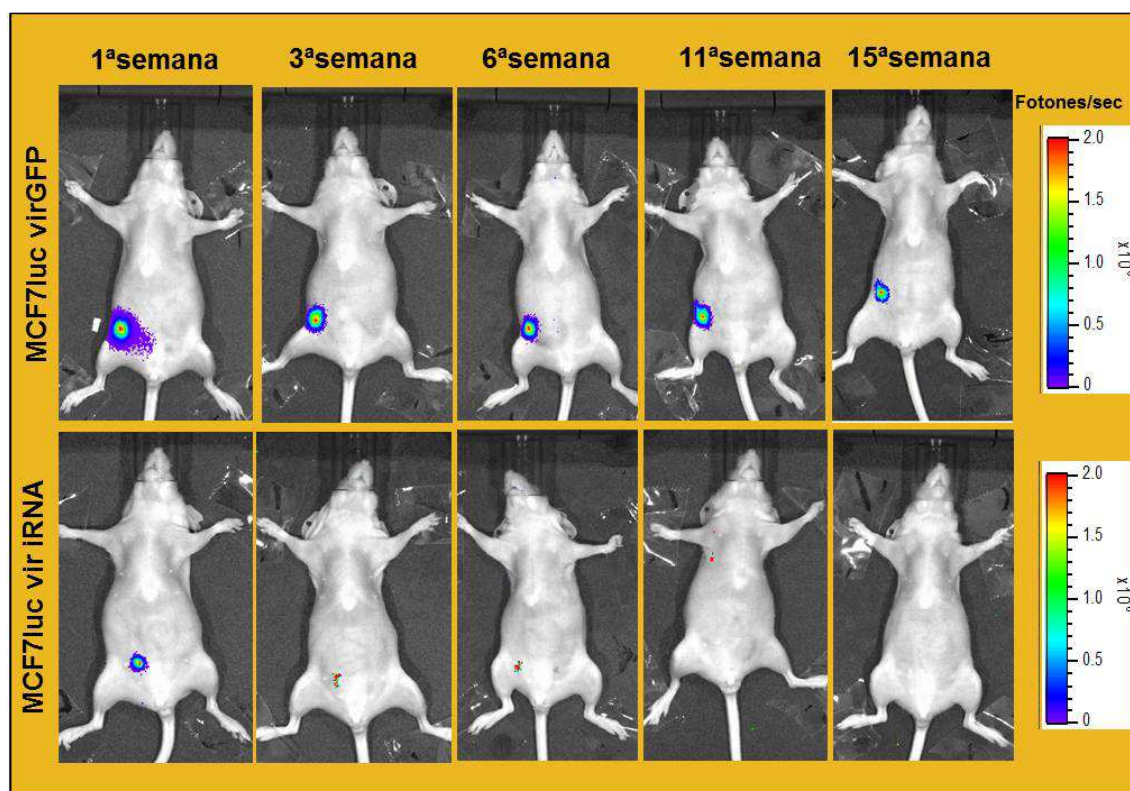


Figura 49. Seguimiento del proceso tumoral mediante técnicas de imagen *in vivo* para las muestras MCF7luc control y MCF7luc interferidas para PTTG1. Las medidas fueron tomadas en fotones/segundos

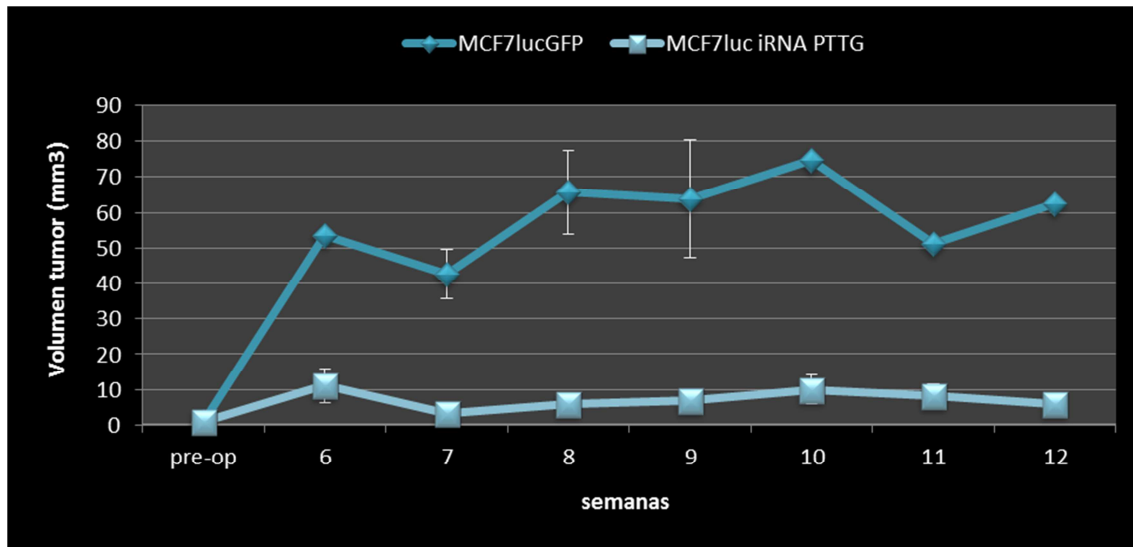


Figura 50. Medidas del tamaño del tumor, a lo largo de 12 semanas, en ratonas transplantadas ortotópicamente en mama con la línea MCF7luc-vir-iRNAPTTG1 y con MCF7luc virGFP (control).

Paralelamente se realizó un seguimiento del tamaño del tumor. Las medidas fueron tomadas en el punto inicial (pre-operatorio) y a lo largo de todo el experimento, semanalmente, hasta alcanzar la semana 12 (post-operatorio) (Figuras 50). Se observa, que desde la 6ª semana, existe una notable diferencia en el tamaño del tumor entre los dos grupos de ratonas. Las células MCF7luc-vir-iRNAPTTG1 no desarrollaron tumor, minimizando su presencia en el tejido graso de la mama y en un 60% de los casos llegaron a ser indetectables tras un corto periodo de tiempo post- xenotransplante (Figura 50).

Durante el experimento, el volumen medio del tumor alcanzado en el grupo de ratonas inyectadas con células sobreexpresando el RNA interferente, fue de $6,8\text{mm}^3$, mientras que el valor medio alcanzado en el grupo control fue de $51,4\text{mm}^3$ (Tabla 15). El análisis histológico de los tejidos mamarios trasplantados ortotópicamente determinó que en las muestras interferidas no se formaba tumor y las células de adenocarcinoma mamario inyectadas habían desaparecido o reducidas a microfocos, mientras que en el grupo control se detectaban claros focos tumorales en todos los casos. (Figura 51).

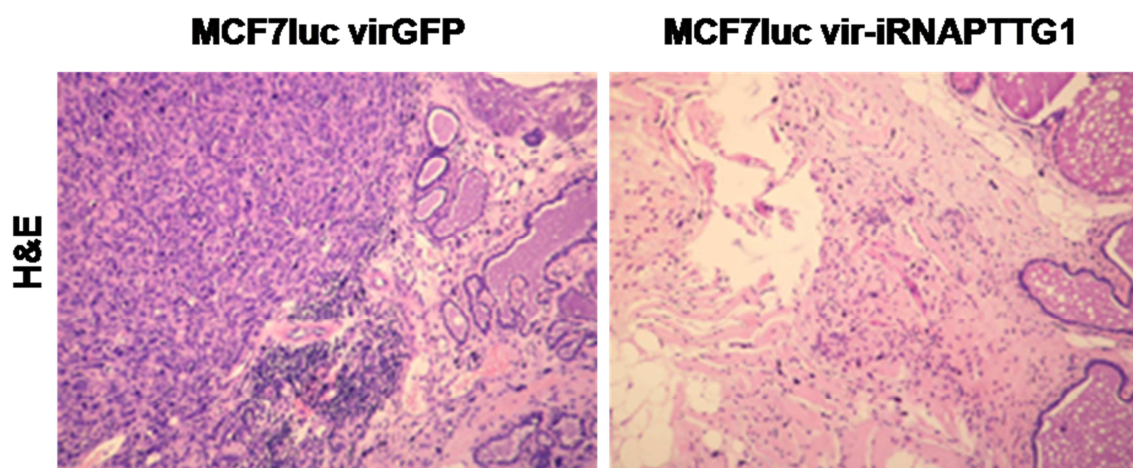


Figura 51. Tinción hematoxilina-eosina de muestras de tejido mamario de ratonas atímicas transplantadas ortotópicamente con las líneas MCF7luc-virGFP (control) y MCF7luc-vir-iRNAPTTG1, tras 15 semanas tratamiento con β -estradiol. En el panel izquierdo se muestran multitud de células teñidas a diferencia del panel derecho donde la tinción celular es mucho más reducida y dispersa.

En ratonas inyectadas con la línea que sobreexpresa PTTG1 se observó un aumento notable de la luminiscencia a partir de la semana 6 con respecto al control. A partir de esta semana, al menos la mitad de las ratonas presentaron un aumento de luminiscencia respecto al grupo control, mostrado en las figuras 48 y 52.

Con respecto a las medidas del tumor de estas ratonas que sobreexpresan *pttg1*, aunque se observa variabilidad entre los individuos, el 40% de las ratonas desarrollaron tumores primarios mayores que los del grupo control. En la figura 62, se observa que las diferencias en el volumen del tumor entre ambos grupos se mantienen durante las 15 semanas, alcanzando las ratonas que sobreexpresan *pttg1*, un volumen medio a lo largo del experimento de 155,53 mm³, tres veces mayor al volumen medio del grupo control, previamente indicado (Figura 53 y tabla 15).

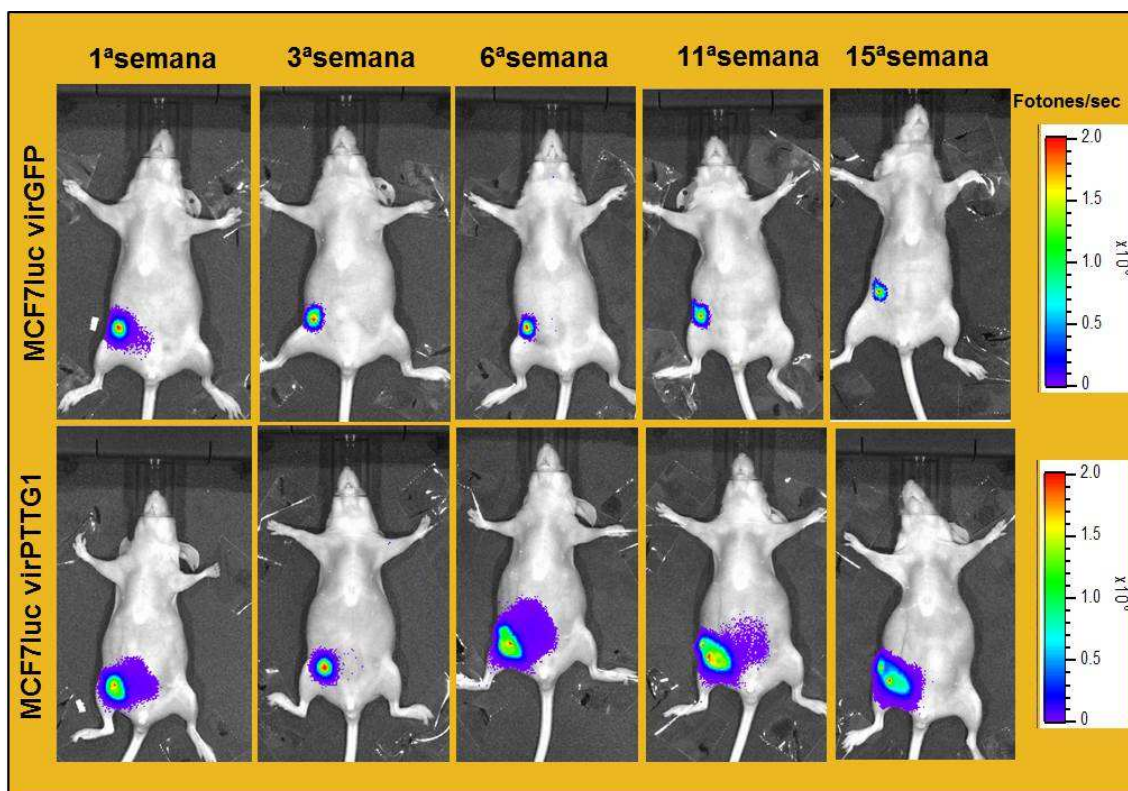


Figura 52. Seguimiento del proceso tumoral mediante técnicas de imagen *in vivo* para las muestras MCF7luc control y MCF7luc sobreexpresando *pttg1*. Las medidas fueron tomadas en fotones/segundos.

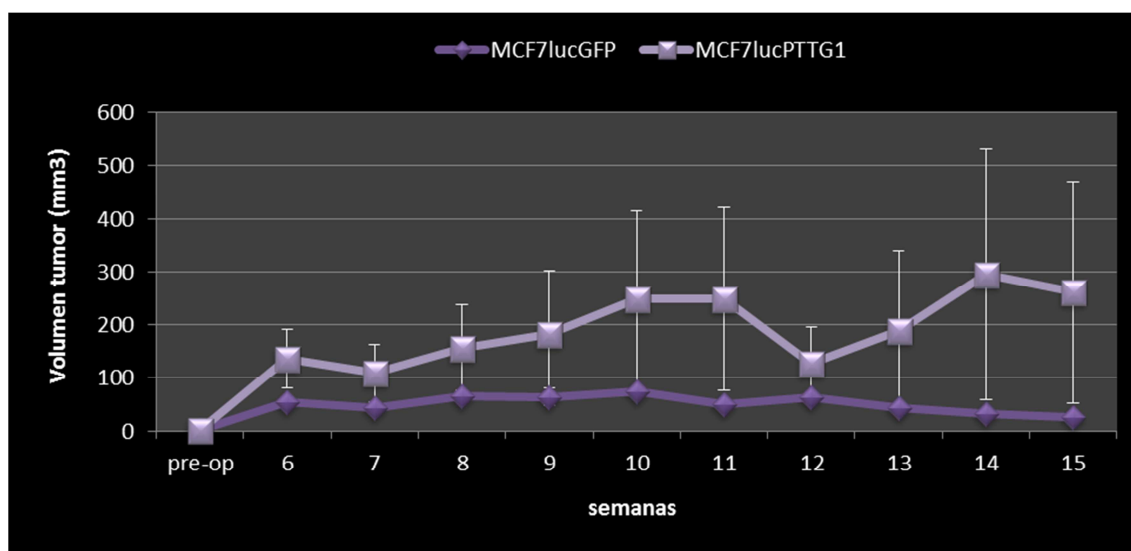


Figura 53. Medida del tamaño del tumor, a lo largo de 15 semanas, en ratonas transplantadas ortotópicamente en mama con la línea MCF7luc virPTTG1 y MCF7luc virGFP como control.

El análisis histológico del grupo que sobreexpresa el gen *pttg1*, mostró tumores primarios con alta proliferación celular en el 40% de los casos, llegando incluso a detectarse zonas internas necróticas (Figura 54).

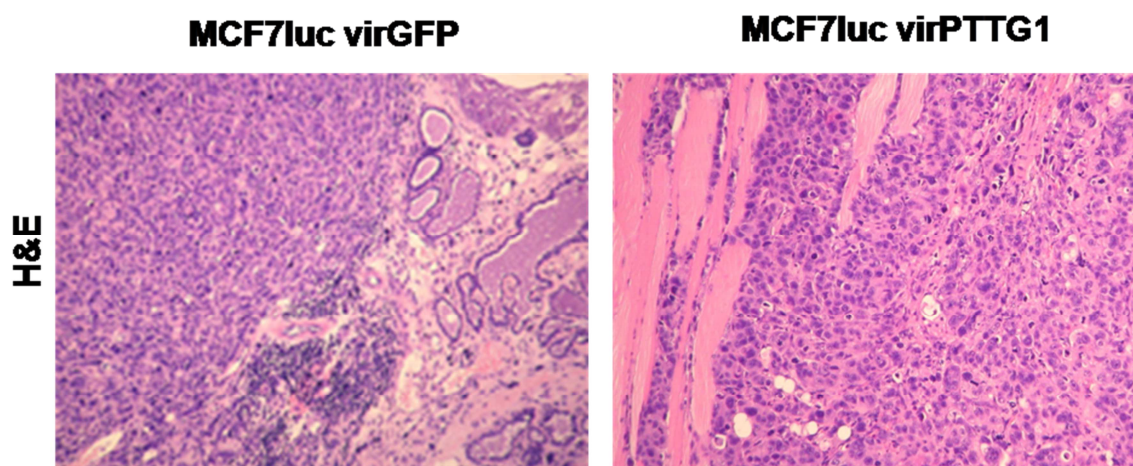


Figura 54. Tinción hematoxilina-eosina de muestras de tejido mamario de ratonas atímicas transplantadas ortotópicamente con las líneas MCF7luc-virGFP (control) y MCF7luc-virPTTG1, tras 15 semanas tratamiento con β -estradiol. En ambas imágenes, las células MCF7 aparecen teñidas con el colorante hematoxilina (morado).

Células	Animales con tumor	Volumen Tumor
MCF7luc virGFP	8/10 *	24,9 -74,8mm ³
MCF7luc virPTTG1	10/10	33,2- 884,7mm ³
MCF7luc vir-iRNAPTTG1	4/10	5,5- 8,2mm ³

*Para esta condición fallecieron 2 ratones antes de llegar al punto final del experimento debido a causas ajenas al tumor.

Tabla 15. Volumen medio de los tumores generados en ratones atímicos por las líneas celulares MCF7luc infectadas con distintas construcciones lentivirales.

DISCUSIÓN

Parte I: Estudiar la capacidad moduladora que ejerce el gen *pttg1* sobre la expresión de genes relacionados con el microambiente del tumor, en células inmortalizadas de ratón NIH3T3.

En 1889, sorprendentemente Paget sugirió lo que fue conocido como la hipótesis de “semilla y suelo” (“*seed and soil*”), que explica cómo las células cancerosas crecen en nichos que les resultan favorables y nos lleva a comprender porque las metástasis se desarrollan en lugares preferidos y no seleccionados bajo el azar (Westhoff et al., 2014; Tsai MJ. et al., 2014). Aunque muchas investigaciones se han focalizado en descubrir las anomalías genéticas que inician y dirigen el cáncer, en la actualidad, hay evidencias abrumadoras que indican que el comportamiento de las células tumorigénicas está también muy influenciado por el microambiente. De hecho, décadas de investigación han guiado hacia la visión de que los tumores son estructuras que asemejan a los órganos, compuestos por numerosos tipos celulares, cuyas interacciones son requeridas para dirigir y promover el crecimiento y metástasis (Korkaya H., 2011).

PTTG1 es una proteína multifuncional que entre sus numerosas funciones, tiene la capacidad de estimular la expresión y secreción de mitógenos relacionados con el microambiente del tumor, como bFGF, VEGF (Thompson AD. et al., 2005) y metaloproteinasas MMP2 y MMP9 (YAN et al., 2015). Esta serie de hallazgos hizo que planteáramos nuestra hipótesis sobre la capacidad de PTTG1 de modular familias génicas relacionadas con el microambiente del tumor. Esta sospecha nos llevó en primer lugar, a realizar un array de RNAm con la línea celular NIH3T3 (NIH3T3cat y NIH3T3 PTTG1), sobre la que previamente se habían descrito efectos de transactivación (Espina AG. Tesis doctoral, 2011). Los resultados de este ensayo, mostraron modulación significativa ($p\text{val} < 0,05$) en los niveles de expresión de un conjunto de 407 genes, aumentando y disminuyendo la expresión de 296 y 111 genes respectivamente. Inicialmente hicimos una selección gen a gen de aquellas moléculas que pudieran estar involucradas en establecer el correcto ambiente para el desarrollo del tumor, y destacamos, un grupo de citoquinas que incrementaban su expresión: TGF β 2, CXCL12, CCL7, CCL2, VEGF, BMP7,

CX3CL1, EGF y TGF β R2. Todas estas citoquinas habían sido relacionadas de alguna forma con el desarrollo del proceso tumoral.

La relación entre *pttg1* y el factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF) es ampliamente conocida y fue descrita por C.J. McCabe y colaboradores, demostrando que la sobreexpresión de PTTG1 guiaba hacia un incremento de la secreción y expresión de bFGF, VEGF y IL-8 (McCabe C.J. et al., 2002; Tariq Hamid et al., 2005; Ishikawa et al., 2001). En el año 2009, nuestro laboratorio publicó un trabajo relacionando los niveles de expresión de PTTG1 y su implicación en adipogénesis a través de la regulación del gen *dlk1* (Espina A.G. tesis doctoral, 2011; Espina A.G. et al., 2009). El gen TGF β 2 codifica para un miembro de la familia TGF β (factor transformante de crecimiento beta), que están involucradas en regular crecimiento, migración e invasión y la desestabilización de la ruta TGF β /SMAD ha sido implicada en una variedad de cánceres humanos (Tarasewicz E. et al., 2012). Recientemente, se ha descrito la capacidad de EGF y su receptor para potenciar la migración en meduloblastoma (Rico-Varela J., 2015). Por otro lado, tanto CXCL12 como CCL2, juegan un papel crítico en numerosos tipos de cánceres (Raman D. et al., 2007; Wang J. et al., 2006; Label-Haziv Y. et al., 2014).

En los últimos tiempos, el gran auge de técnicas genómicas ha creado la necesidad de desarrollar multitud de herramientas que permiten al experimentador tener una visión más global de los procesos y rutas alterados en el análisis de un array, ya que establece relaciones entre genes. Por este motivo, empleamos diferentes herramientas bioinformáticas para establecer aquellos procesos afectados como consecuencia de la sobreexpresión de PTTG1 sobre el fondo celular NIH3T3. Observamos entonces, que según su proceso biológico (ontología génica) aparecían modulados genes relacionados con la organización de la matriz extracelular, estructuras extracelulares y regulación positiva de la migración. Si establecemos una ordenación según las rutas afectadas, podemos ver desreguladas vías de adhesión focal, interacción con receptores ECM, e interacción citoquinas-receptores citoquinas (Fig.21). Estos resultados nos muestran cómo PTTG1 no solo juega un papel crucial dentro de la célula potenciando su actividad transformadora (Kakar S. et al., 1999; Hamid T, Kakar S. 2004), sino que además, induce cambios que

repercuten en la interacción de esa célula con su entorno, apoyando datos previamente publicados (Thomson AD. et al., 2005; YAN et al., 2015).

Para realizar un estudio más profundo, uno de nuestros genes candidatos fue CXCL12, que juega un papel crítico como quimioatrayente en el desarrollo del cáncer. Hasta el momento, los datos obtenidos han sugerido que la expresión de CXCL12 por parte de los fibroblastos y la expresión de CXCR4 por parte de la célula tumoral desencadena crecimiento, motilidad e invasión. Es importante destacar que son los fibroblastos asociados al tumor, y no los fibroblastos normales, los que estimulan la progresión tumoral a través de la secreción de CXCL12 (Sun X. et al., 2010). En los resultados que aquí presentamos, mediante el uso de diversas técnicas (Array de RNAm, PCR real-time y array de PCR) hemos confirmado la inducción de la citoquina CXCL12 en fibroblastos de ratón, como consecuencia de la sobreexpresión del gen *pttg1* (Fig.23, fig. 25 y fig.26).

Durante muchos años, se pensó que CXCR4 era el único receptor de CXCL12, pero trabajos recientes han puesto de manifiesto que CXCL12 se une también a CXCR7. En los arrays de citoquinas, obtuvimos una bajada de los niveles de proteína de CXCR4 en el fibroblasto, en condiciones de sobreexpresión de PTTG1 (Fig.25). Esto podría ser debido en primer lugar, a que son las células tumorales las que responden a este estímulo a través de sus receptores CXCR4 y CXCR7, en segundo lugar, CXCL12, ejerce dos tipos de efectos, uno paracrino sobre las células que la rodean y otro autocrino, sobre ella misma. Recientes descubrimientos han puesto de manifiesto que la bajada de receptores CXCR4 en células “normales”, provoca una reducción de la señal paracrina guiando a la pérdida de adhesión celular y debilitando las uniones células-ECM, facilitando que las células se liberen de su entorno y puedan migrar. Retomando nuestros resultados del array de RNAm, efectivamente, se ven reprimidas las interacciones con receptores ECM y está regulada positivamente la migración y motilidad celular, en concordancia con lo expuesto.

Otro de los genes objeto de nuestro estudio fue la quimioquina CCL2, que es conocida por su capacidad de reclutar monocitos y macrófagos hacia

los sitios de inflamación (Tsuyada A. et al., 2012) y mediar interacciones entre las células normales y malignas dentro del microambiente del tumor. Su expresión ha sido demostrada en muchos tipos de cáncer incluidos próstata, ovario, gástrico, renal, colorectal, esofageal y mieloma múltiple (Zhang J., 2011). En esta tesis se muestra cómo la sobreexpresión de PTTG1 en fibroblastos de ratón, conlleva a un incremento en los niveles transcripcionales, mediante array de RNAm y PCR tiempo real (Fig. 23, fig.25 y fig. 26), y proteicos, detectados a través de western blot, de CCL2 (Fig.28). A su vez hemos detectado incremento de la señal del gen reportero luciferasa, bajo la región reguladora 2.8/5 de MCP1, en condiciones de inducción de nuestro gen (Fig. 30). Consideramos por ello que PTTG1, a través de la modulación de citoquinas, participa en el desarrollo del microambiente del tumor.

La migración celular es un proceso enormemente complejo, en el cuál, se suceden una serie de reorganizaciones tanto en el interior como en el exterior de la célula. Esta complejidad se mantiene gracias a la participación de más de 140 genes, activando o reprimiendo rutas, que extienden protuberancias, forman uniones en el frente de avance y liberan adhesiones. Estos pasos requieren de la remodelación del citoesqueleto de actina, a través de pequeñas GTPasas de la familia Rho, que son los reguladores clave de la dinámica del citoesqueleto (Kanazawa S. et al., 2010).

El proceso de wound healing, está regulado por numerosos factores de crecimiento como el factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento transformante β (TGF β) factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y factor de crecimiento básico de fibroblastos (bFGF) (Kanazawa S. et al., 2010), todos ellos modulados a su vez por la sobreexpresión del gen *pttg1* (Boelaert et al., 2004; Chien and Pei, 2000; McCabe et al., 2002).

Los resultados procedentes de los ensayos de migración y tracking aquí presentados (Fig. 31 y Fig. 32) muestran una inducción de la migración y una mejor capacidad del fibroblasto para separarse del frente de avance, obteniendo en la mayoría de los casos trayectorias más largas, en NIH3T3 PTTG1. Estos datos se apoyan en los resultados obtenidos en el array de

RNAm del apartado 2.1 del capítulo de resultados, donde en condiciones de sobreexpresión de PTTG1, aparecen modulados genes relacionados con adhesión focal, adhesión célula-célula, regulación de la locomoción, migración, motilidad y reorganización de la matriz (Fig. 21). Nuestros datos van en concordancia a su vez, con resultados obtenidos por otros grupos de investigación en los que se describe la inducción por parte de PTTG1 de factores de crecimiento, que ahora se conocen estar relacionados con la inducción de la migración, e incluso la participación de PTTG1 en la nucleación de microtúbulos en células RPE1 (Moreno-Mateos MA., 2011). Parece claro por tanto, que entre otras funciones, PTTG1 participaría en el proceso transformador de la célula potenciando su capacidad de migración, favoreciendo el paso de estas células al torrente sanguíneo.

Con este primer apartado de nuestro trabajo de investigación, podemos concluir que PTTG1 tiene capacidad moduladora sobre CXCL12 y CCL2, entre otras citoquinas, contribuyendo a crear un microambiente adecuado para el desarrollo del tumor y favoreciendo la movilidad de los fibroblastos presentes en este entorno.

PARTE II: Determinar la capacidad transactivadora del gen *pttg1* en células humanas y estudio de su posible implicación biológica.

Durante el desarrollo de nuestro trabajo, hemos creado varias líneas celulares humanas de distintos orígenes, en condiciones de sobreexpresión e interferencia del gen *pttg1* (Fig. 33, 34 y 35) y hemos podido comprobar, cómo el fondo genético donde se desarrolla es crucial para la capacidad moduladora de nuestro gen. Observando un incremento de la expresión de CCL2 en la línea celular HCT116virPTTG, además del incremento de CXCL12 en MCF7virPTTG, mostrando que su capacidad moduladora sobre citoquinas también ocurre en líneas tumorales humanas procedentes de diferentes tipos de tumor. Observamos a su vez, la existencia de un vínculo común en los distintos arrays realizados, tanto en condiciones de sobreexpresión como de interferencia del gen *pttg1*. Se trata de varios componentes del sistema IGF, entre los que encontramos modulados positivamente IGF1 e IGFBP7, y negativamente IGF2R e IGFBP6 (array de citoquinas) en NIH3T3PTTG1. Mientras que en condiciones de interferencia para *pttg1* en la línea celular MCF7, observamos la disminución de IGFBP7, IGF2R e IGF2 y el incremento de IGFBP6.

Los datos obtenidos en los estudios de arrays de RNAm sobre el fondo MCF7 de adenocarcinoma de mama, indican cómo la sobreexpresión de PTTG1 actúa sobre familias génicas relacionadas con funciones biológicas que regulan la morfogénesis, pequeñas GTPasas que median la transducción de señal y organización del citoesqueleto de actina. A nivel de rutas, cabe destacar el aumento de expresión de las Rho GTPasas. Bajo estas condiciones, se ven reprimidas las funciones biológicas asociadas a procesos catabólicos y rutas de parada de ciclo y apoptosis. Todo ello indica que la sobreexpresión del gen *pttg1* va encaminada hacia apoyar los procesos de supervivencia en la célula tumoral (Fig.45).

La interferencia de PTTG1 en MCF7, provocó una modulación positiva de familias génicas con función biológica de respuesta a virus y señalización mediada por citoquinas, de rutas de señalización de receptores tipo Toll y

apoptosis. Por otro lado, se ven reprimidas funciones biológicas asociadas con la regulación de la migración, la adhesión focal y la interacción con receptores ECM. La modulación de estos genes, irían en concordancia con el fenotipo observado para las células MCF7 interferidas, que pierden su adhesión al sustrato progresivamente y permanecen flotando en el sobrenadante del cultivo hasta que finalmente terminan por desaparecer (Fig. 46).

En los últimos tiempos, los avances tecnológicos permitieron detectar que si bien la sobreexpresión del gen *pttg1* tiene un papel crucial en el desarrollo del tumor, la bajada de sus niveles tiene un fenotipo de máxima relevancia. En el año 2006, Sham S, Kakar, publicó un novedoso estudio, donde se demostraba que la bajada de los niveles de PTTG1 en líneas de NSCLC (non-small cell lung carcinoma) como H1299, tenía como consecuencia la inhibición del crecimiento del tumor tanto *in vitro* como *in vivo* (Kakar SS. Et al., 2006). Además llevaba asociado un descenso en los niveles de células CD34 positivas y disminución de la expresión de Ki67 y bFGF. Este mismo año, se presentaba otro trabajo siguiendo la misma línea, donde la bajada de PTTG1 en células de hepatoma activaba la apoptosis a través de p53 y p21. A su vez, esta bajada provocaba un efecto citotóxico en adenocarcinoma de colon HCT116 (Cho-Rok J. et al., 2006). Para cáncer de ovario, este mismo efecto fue descrito un año más tarde, resultando en una inhibición de la proliferación, formación de colonias y menor desarrollo tumoral tanto *in vivo* como *in vitro* (El-Naggar et al., 2007). En 2012 se observó también este efecto en la línea celular PC3 de cáncer de próstata, donde la bajada de PTTG1 reducía la tasa de proliferación y formación de colonias, resultando en una parada en la fase G1 del ciclo celular (S.Q. Huang et al., 2012).

Durante estos años, esta serie de publicaciones asociadas al fenotipo que observamos al interferir *pttg1*, en la línea de adenocarcinoma de mama MCF7, centró gran parte de nuestra atención, ya que hasta el momento, no había sido descrito este efecto para esta línea celular.

En el desarrollo de nuestro trabajo, a partir de un fenotipo observado al microscopio invertido, tratamos de determinar que funciones se estaban viendo alteradas en la célula. Para ello, uno de los pasos determinantes fue estudiar la

tasa de proliferación de estos cultivos (Fig.38), durante 7 días se tomaron medidas de su crecimiento, acompañado de imágenes de células teñidas con sulforrodamina B. A los 7 días, los cultivos control y de sobreexpresión llegaban a confluencia, mientras que las células interferidas presentaban una tasa de proliferación del 25%. El análisis de ciclo celular para estas condiciones, mostró que el knockdown de PTTG1 presentaba una parada en la fase G1, explicando en parte la inhibición del crecimiento (Fig.39), al igual que ocurriera en la línea celular PC3 según lo publicado por S.Q. Huang (Huang SQ. et al., 2012). Estos resultados unidos a la baja tasa de proliferación de esta línea, parece indicar que la interferencia del gen *pttg1* esté afectando al desarrollo normal de MCF7, bien por inhibición directa de su crecimiento o por inducción de algún tipo de muerte celular.

El alto número de células que encontrábamos flotando en el sobrenadante del cultivo de la línea MCF7luc vir iRNA PTTG1, impulsó que quisiéramos determinar el estado de las mismas. Para ello, recogimos los sobrenadantes y los teñimos con azul tripan. El recuento celular puso en evidencia el alto número de células que habían perdido la adherencia al sustrato, apoyando los datos obtenidos en el array de RNA mensajero en condiciones de interferencia, donde se muestra inhibición de rutas de adhesión focal y descenso de la interacción con ECM (Fig. 46) y el aumento de la expresión de IGFBP6 que participa en dicho proceso: falta de proliferación, incremento de la apoptosis y disminución de la adhesión celular. De estas células, entorno al 50% se encontraban muertas y el resto aún vivas, probablemente iniciando rutas de señalización que las conducirían hacia la muerte (Fig.41). Un estudio realizado en el año 2012, mostró que la interferencia del gen *pttg1* en la línea Bt549, disminuía la capacidad de formar colonias y el tamaño de las esferas tridimensionales, a la vez que su sobreexpresión incrementaba los niveles de migración e invasión en las líneas Bt549 y MCF10a (Yoon CH. et al., 2012).

La detección de estas señales tempranas de inducción de muerte celular se determinaron mediante marcaje con Anexina V, mostrando un incremento del 15% de células Anexina V positivas para la línea interferida, en consonancia con el incremento de expresión de rutas relacionadas con

apoptosis, que se aprecia en los arrays anteriormente citados para esta condición (Fig. 46 y Fig. 43), confirmando así que un porcentaje de las células están activando señales para la entrada en apoptosis e incrementando la expresión del receptor de muerte celular Fas, como se muestra en la figura 53.

Entre los diferentes tipos de muerte celular encontramos el anoikis, como un tipo particular de apoptosis inducida por una inapropiada interacción de la célula con la matriz extracelular (célula-ECM), siendo el mejor fenotipo caracterizado provocado por la pérdida de anclaje, en células epiteliales anclaje dependientes (Chiarugi P. et al., 2008; Paoli P. et al., 2013). Pero se ha observado que la pérdida de adhesión de las células al ECM inducen una variedad de fenotipos de muerte celular que son diferentes al típico anoikis; esto incluye entosis, autofagia y transdiferenciación escamosa (Chipuk JE. et al., 2005; Grassian AR et al., 2011; Buchheit CL. et al., 2012). La diversidad emergente de fenotipos de muerte celular, requiere una extensión en su estudio, más allá de la clásica adhesión dependiente de anoikis (Ishikawa F., 2015). Hasta el momento, un considerable número de estudios han sugerido que anoikis es el fenotipo de muerte celular predominante en células del epitelio mamario debida a pérdida de anclaje. Sin embargo, muchos de estos estudios han utilizado como modelo células mioepiteliales o clasificadas en el subtipo basal, como MCF10a (Neve RM. et al., 2006; Kao J. et al., 2009), mientras que la mayoría de las células de cáncer de mama maligno, muestran características del subtipo luminal, por lo que para este subtipo, aún quedaría por determinar el fenotipo más probable de muerte celular asociado a pérdida de anclaje.

Nuestros estudios sobre el fenotipo que produce la interferencia del gen *pttg1* en células epiteliales de origen luminal MCF7, pudo concluir con la afirmación de que la bajada de los niveles de nuestro gen, producen una disminución de la proliferación celular, una parada en fase G0-G1 y una muerte celular asociada a pérdida de anclaje con inducción de Fas, justificada total o parcialmente por la entrada en apoptosis. Consideramos necesario desde nuestro punto de vista, ampliar el estudio hacia los estados de fosforilación de las distintas rutas responsables de llevar a la célula hacia este destino, para poder así determinar el tipo de muerte específica responsable de nuestro

fenotipo, o si bien, existe un efecto cooperativo entre distintos procesos de muerte, tal y como se describe en la muerte celular dependiente de pérdida de anclaje inducida por FAK en células epiteliales de origen mamario inmortalizadas (TertHMECs) (Ishikawa F. et al., 2015), donde coexisten al menos entosis, cornificación y necrosis dentro de la misma estructura morfológica.

PARTEIII: Estudio del modelo animal de xenotransplante en mama con la línea celular MCF7 en condiciones de sobreexpresión e interferencia de pttg1.

El cáncer de mama es el tumor más frecuente en las mujeres occidentales. En España se diagnostican alrededor de 25.000 nuevos casos cada año. En los últimos 15 años, se ha detectado la sobreexpresión de PTTG1 en tumores derivados de distintos tejidos, incluyendo pituitaria, tiroides, testículos, mama, ovario, colon y esofageal (Vlotides G. et al. 2007; Chintharlapalli S., 2011). Estos trabajos han establecido vínculos entre la expresión de PTTG1 y la agresividad del tumor, como por ejemplo en cáncer de mama (Ogbagabriel S. et al., 2005), en tumores esofageales con metástasis (Shibata Y. et al., 2002) o en tumores de colon (Heaney AP. et al., 2000; Sáez et al. 1999, Solbach et al. 2004), aunque en la actualidad, aún no se conoce el mecanismo exacto a través del cual participa.

El uso de modelos animales, ha permitido grandes avances en el estudio del cáncer y sobre todo el descubrimiento de nuevas terapias, ya que nos permite tener un sistema mucho más real donde participa un entorno más apropiado. El modelo más común empleado en cáncer de mama, consistía en inyectar células tumorales en ratones directamente en la circulación, a través de la vena de la cola o el ventrículo izquierdo del corazón; este modelo no permite analizar la capacidad de las células para invadir o extravasar al torrente sanguíneo (Francia G et al., 2011). Un nuevo modelo ideal que reproducía todas las etapas del tumor, incluido escape y diseminación, seguido de colonización y crecimiento en sitios distales, se basaba en el xenotransplante ortotópico de células tumorales en el tejido graso de la mama (fat-pad mamario). En nuestro laboratorio desarrollamos este modelo sobre ratonas atímicas para el completo estudio sobre la participación de PTTG1 en el desarrollo y metástasis de tumores de mama. Inicialmente, las células inyectadas llevaban únicamente el gen reportero GFP con las distintas construcciones, pero pudimos comprobar que debido a la autofluorescencia de los tejidos y la menor sensibilidad del método, no es recomendable el uso de este sistema para detectar posibles metástasis o inhibición del desarrollo tumoral. Es por ello que elaboramos un sistema basado en el gen de luciferasa,

mucho más sensible y que permite detectar señales sin interferencias. Como se describe en el apartado 1 del capítulo III de resultados, realizamos xenotransplantes ortotópicos para las condiciones de sobreexpresión, control e interferencia de PTTG1 (MCF7luc virPTTG1, MCF7luc virGFP y MCF7luc vir iRNA PTTG1). Los resultados obtenidos mostraron que las células MCF7 que sobreexpresaban el gen *pttg1*, desarrollaban un tumor de mayor tamaño que el grupo control en el 40% de los casos. El seguimiento a través de técnicas de imagen *in vivo* mostró un incremento progresivo de los niveles de luminiscencia, no detectando metástasis en ninguno de los casos a lo largo de 15 semanas de seguimiento (Fig. 48, fig. 52-54 y tabla 15). El análisis histológico mediante tinción con hematoxilina-eosina reveló la presencia y crecimiento de nuestras células en el tejido graso de la mama, tanto en la condición de sobreexpresión como en la condición control. Para los ratones inyectados con la línea MCF7 knockdown para *pttg1*, el volumen del tumor se redujo al mínimo durante las primeras semanas, siendo en la mayoría de los casos inapreciables. En concordancia con estos datos, las medidas de luminiscencia fueron mínimas, teniendo que aumentar la exposición de los animales para poder detectar los microfocos presentes, que desaparecieron transcurridas varias semanas. El análisis histológico puso en evidencia la inviabilidad de estas células incluso en un nicho adecuado, mostrando un número residual de células en el tejido graso de la mama (Fig. 48-51 y tabla 15).

Tomando en conjunto estos datos, podemos confirmar que la sobreexpresión de PTTG1 en la línea de adenocarcinoma de mama MCF7, favorece el desarrollo del tumor, sin otorgar capacidad metastásica, al menos durante el tiempo de seguimiento. De modo consistente, la interferencia de PTTG1 sobre la línea tumoral MCF7, provoca una inhibición del crecimiento y desarrollo del tumor, probablemente como consecuencia de la inducción de mecanismos de muerte celular. Estos resultados indicaban que la ausencia o disminución de los niveles de proteína PTTG1 en la línea celular MCF7 de adenocarcinoma de mama, atenúa o dificulta su desarrollo tumoral, llegando a una recesión completa en algunos casos. Este efecto causado por la falta o disminución de la proteína PTTG1 en modelos *in vivo*, es por primera vez

descrita para células MCF7 de adenocarcinoma de mama, estudiado en líneas tumorales de cáncer de pulmón H1299 (*Kakar S. and Malik M., Internacional Journal of Oncology, 2006*), de ovario A2780 (*Kakar S. et al., Internacional Journal of Oncology, 2007*) y de carcinoma Hepatocelular HCC (*Jung Ch. et al, Hepatology, 2006*).

CONCLUSIONES

1. La sobreexpresión del gen *pttg1* aumenta la expresión de citoquinas, como CXCL12, que podría intervenir positivamente en el desarrollo del microambiente del tumor y CCL2, que participaría en el reclutamiento de mediadores del sistema inmune.
2. La sobreexpresión del gen *pttg1* regula la actividad de familias génicas relacionadas con adhesión focal e interacción con la matriz extracelular (ECM), mejorando la capacidad migratoria de los fibroblastos NIH3T3. Este proceso de migración, está íntimamente relacionado la adquisición de propiedades metastásicas.
3. La interferencia del gen *pttg1* sobre la línea de adenocarcinoma de mama MCF7, induce una disminución de la tasa de proliferación, parada en fase G0-G1, pérdida de adhesión al sustrato y muerte celular.
4. La inhibición del gen *pttg1* en xenotransplantes ortotópicos, generados con la línea celular MCF7, frena el desarrollo del tumor. Mientras que su sobreexpresión mejora el desarrollo de las células tumorales, aunque no le confiere *per se* la capacidad de metastatizar.

BIBLIOGRAFÍA

- Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. (2003). Prospective identification of tumorigenic Breast cancer cell. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 3983-8
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K. (1989). Current protocols in molecular biology. *New York: Greene Publishing & Wiley-Interscience, NY.*
- Balzac F, Avolio M, Degani S, Kaverina I, Torti M, Silengo L, Small JV, Retta SF. (2005). E-cadherin endocytosis regulates the activity of Rap1: a traffic light GTPase at the crossroads between cadherin and integrin function. *J Cell Sci* 118: 4765-83.
- Bernal JA, Luna R, Espina A, Lázaro I, Ramos-Morales F, Romero F, Arias C, Silva A, Tortolero M, Pintor-Toro JA. (2002). Human securin interacts with p53 and modulates p53-mediated transcriptional activity and apoptosis. *Nat Genet* 32: 306-11.
- Bernal JA & Hernandez A 2007 p53 stabilization can be uncoupled from its role in transcriptional activation by loss of PTTG1/securin. *Journal of Biochemistry* 141 737–745.
- Bernal JA, Roche M, Méndez-Vidal C, Espina A, Tortolero M, Pintor-Toro JA. (2008). Proliferative potential after DNA damage and non-homologous end joining are affected by loss of securing. *Cell Death Differ* 15: 202-12.
- Berrier AL, Yamada KM. (2007). Cell-matrix adhesion. *J Cell Physiol* 213: 565–573.
- Bhowmick NA, Neilson EG, Moses HL. (2004). Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature* 432: 332-7.
- Boelaert K, McCabe CJ, Tannahill LA, Gittoes NJ, Holder RL, Watkinson JC, Bradwell AR, Sheppard MC, Franklyn JA. (2003). Pituitary tumor transforming gene and fibroblast growth factor-2 expression: potential prognostic indicators in differentiated thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 88: 2341-2347.
- Boelaert K, Smith VE, Stratford AL, Kogai T, Tannahill LA, Watkinson JC, Eggo MC, Franklyn JA, McCabe CJ. (2007). PTTG and PBF repress the human sodium iodide symporter. *Oncogene* 26: 4344-56.
- Boelaert K, Yu R, Tannahill LA, Stratford AL, Khanim FL, Eggo MC, Moore JS, Young LS, Gittoes NJ, Franklyn JA, Melmed S, McCabe CJ. (2004). PTTG's C-terminal PXXP motifs modulate critical cellular processes in vitro. *J Mol Endocrinol* 33: 663-77.
- Chamaon K, Kirches E, Kanakis D, Braeuninger S, Dietzmann K & Mawrin C (2005) Regulation of the pituitary tumor transforming gene by insulin-like-growth factor-I and insulin differs between malignant and nonneoplastic astrocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 331 86–92.
- Chen L, Puri R, Lefkowitz EJ, Kakar SS. (2000). Identification of the human pituitary tumor transforming gene (hPTTG) family: molecular structure, expression, and chromosomal localization. *Gene* 248: 41-50.
- Chen CC, Chang TW, Chen FM, Hou MF, Hung SY, Chong IW, Lee SC, Zhou TH & Lin SR 2006 Combination of multiple mRNA markers (PTTG1, Survivin, UbcH10 and TK1) in the diagnosis of Taiwanese patients with breast cancer by membrane array. *Oncology* 70 438–446.
- Buchheit CL, Rayavarapu RR, Schafer ZT.(2012) The regulation of cancer cell death and metabolism by extracellular matrix attachment. *Semin Cell Dev Biol* ; 23: 402–411.
- Cheng GZ, Chan J, Wang Q, Zhang W, Sun CD, Wang LH. (2007) Twist transcriptionally upregulates AKT2 in breast cancer cells leading to increased migration, invasion, and resistance to paclitaxel. *Cancer Res* 67: 1979-87.
- Chesnokova V, Kovacs K, Castro AV, Zonis S, Melmed S. (2005). Pituitary hypoplasia in Pttg^{-/-} mice is protective for Rb^{+/+} pituitary tumorigenesis. *Mol Endocrinol* 19: 2371-9.
- Chesnokova V, Zonis S, Rubinek T, Yu R, Ben-Shlomo A, Kovacs K, Wawrowsky K, Melmed S. (2007). Senescence mediates pituitary hypoplasia and restrains pituitary tumor growth. *Cancer Res* 67: 10564-72.
- Chiarugi P, Giannoni E. (2008). Anoikis: a necessary death program for anchorage-dependent cells. *Biochem Pharmacol* 76: 1352-64.
- Chien W, Pei L. (2000). A novel binding factor facilitates nuclear translocation and transcriptional activation function of the pituitary tumor-transforming gene product. *J Biol Chem* 275: 19422-19427.
- Chintharlapalli S, Papineni S, Lee SO, Lei P, U Jin UH, Sherman SI, Santarpia L, Safe S. (2011). Inhibition of pituitary tumor-transforming gene-1 in thyroid cancer cells by drugs that decrease specificity proteins. *Mol Carcinog*. September ; 50(9): 655–667.
- Chipuk JE, Green DR (2005). Do inducers of apoptosis trigger caspase-independent cell death? *Nat Rev Mol Cell Biol*. Mar;6(3):268-75.
- Cho, R.W., and Clarke, M.F. (2008). Recent advances in cancer stem cells. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 18, 1–6.
- Cho-Rok J, Yoo J, Jang YJ, Kim S, Chu IS, Yeom YI, Choi JY, Im DS. (2006). Adenovirus-mediated transfer of siRNA against PTTG1 inhibits liver cancer cell growth in vitro and in vivo. *Hepatology* 43: 1042-1052.

- Christopoulou L, Moore JD, Tyler-Smith C. (2003). Over-expression of wild-type Securin leads to aneuploidy in human cells. *Cancer Lett* 202: 213-8.
- Clem AL, Hamid T, Kakar SS. (2003). Characterization of the role of Sp1 and NF-Y in differential regulation of PTTG/securin expression in tumor cells. *Gene* 322: 113-121.
- Cox D, Brennan M, Moran N. (2010). Integrins as therapeutic targets: lessons and opportunities. *Nat Rev Drug Discov* 9: 804-20.
- Dai J, Sullivan BA, Higgins JM. (2006). Regulation of mitotic chromosome cohesion by Haspin and Aurora B. *Dev Cell* 11: 741-50.
- Darnell JE Jr. (1997). STATs and gene regulation. *Science* 277: 1630-5.
- Derynck R, Akhurst RJ. (2007). Differentiation plasticity regulated by TGF-beta family proteins in development and disease. *Nat Cell Biol* 9: 1000-4.
- Deschesnes RG, Patenaude A, Rousseau JL, Fortin JS, Ricard C, Côté MF, Huot J, C-Gaudreault R, Petitclerc E. (2007). Microtubule-destabilizing agents induce focal adhesion structure disorganization and anoikis in cancer cells. *J Pharmacol Exp Ther* 320: 853-64.
- Dominguez A, Ramos-Morales F, Romero F, Ríos RM, Dreyfus F, Tortolero M, Pintor-Toro JA. (1998). hpttg, a human homologue of rat pttg, is overexpressed in hematopoietic neoplasms. Evidence for a transcriptional activation function of hPTTG. *Oncogene* 17: 2187-2193.
- Drees F, Pokutta S, Yamada S, Nelson WJ, Weis WI. (2005). Alpha-catenin is a molecular switch that binds E-cadherin-beta-catenin and regulates actin-filament assembly. *Cell* 123: 903-15.
- Egeblad M, Werb Z. (2002). New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer* 2: 161-74.
- El-Naggar S, Malik M, Kakar S. (2007) Small interfering RNA against PTTG: a novel therapy for ovarian cancer. *Int J Oncol* ,31:137-143.
- Espina AG, Méndez-Vidal C, Moreno-Mateos MA, Sáez C, Romero-Franco A, Japón MA, Pintor-Toro JA. (2009). Induction of Dlk1 by PTTG1 inhibits adipocyte differentiation and correlates with malignant transformation. *Mol Biol Cell* 20: 3353-62.
- Espina AG. (2010). Función de la proteína PTTG1 en la regulación de la expresión del gen *dlk1* en procesos de proliferación y diferenciación. Análisis funcional de las isoformas PTTG1, PTTG2 y PTTG3. Tesis Doctoral. CABIMER. Sevilla.
- Ezratty EJ, Partridge MA, Gundersen GG. (2005). Microtubule-induced focal adhesion disassembly is mediated by dynamin and focal adhesion kinase. *Nat Cell Biol* 7: 581-90.
- Farrelly N, Lee YJ, Oliver J, Dive C, Streuli CH. (1999) Extracellular matrix regulates apoptosis in mammary epithelium through a control on insulin signaling. *J Cell Biol* 144: 1337-1348.
- Filippella M, Galland F, Kujas M, Young J, Faggiano A, Lombardi G, Colao A, Meduri G, Chanson P. (2006). Pituitary tumour transforming gene (PTTG) expression correlates with the proliferative activity and recurrence status of pituitary adenomas: a clinical and immunohistochemical study. *Clin Endocrinol (Oxf)* 65: 536-43.
- Frisch SM. (1999). Evidence for a function of death-receptor-related, death-domain-containing proteins in anoikis. *Curr Biol* 9: 1047-9.
- S.M. Frisch, R.A. Screaton, Anoikis mechanisms, *Curr. Opin. Cell Biol.* 13 (2001). 555–562.
- Fong MY, Farghaly H, Kakar SS. (2012). Tumorigenic potential of pituitary tumor transforming gene (PTTG) in vivo investigated using a transgenic mouse model, and effects of cross breeding with p53 (+/-) transgenic mice. *BMC Cancer*. 2012 Nov 20;12:532.
- Francia G, Cruz-Munoz W, Man S, Xu P, and Kerbel RS. (2011) Mouse models of advanced spontaneous metastasis for experimental therapeutics *Nat Rev Cancer*. February ; 11(2): 135–141
- Fuchs BC, Fujii T, Dorfman JD, Goodwin JM, Zhu AX, Lanuti M, Tanabe KK. (2008). Epithelial-to-mesenchymal transition and integrin-linked kinase mediate sensitivity to epidermal growth factor receptor inhibition in human hepatoma cells. *Cancer Res* 68: 2391-9.
- Fukai F, Mashimo M, Akiyama K, Goto T, Tanuma S, Katayama T. (1998). Modulation of apoptotic cell death by extracellular matrix proteins and a fibronectin-derived antiadhesive peptide. *Exp Cell Res* 242: 92-99.
- Funabiki H, Yamano H, Kumada K, Nagao K, Hunt T, Yanagida M. (1996). Cut2 proteolysis required for sister-chromatid separation in fission yeast. *Nature* 381: 438-41.
- Galluzzi L , Vitale I , Abrams JM , Alnemri ES , Baehrecke EH , Blagosklonny MV , Dawson TM , VL Dawson , WS El-Deiry , S Fulda , E Gottlieb , DR Green , MO Hengartner , O Kepp , RA Knight , S Kumar , SA Lipton ,X Lu , F Madeo , ez , P Mehlen , G Nun , ME Peter , Piacentini M, Rubinsztein DC , Shi Y , Simon HU , Malorni W, White E , Yuan J , Zhivotovsky B, Melino G, Vandenabeele KP. (2012). Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death and Differentiation* (2012) 19, 107–120
- Genkai N, Homma J, Sano M, Tanaka R, Yamanaka R. (2006). Increased expression of pituitary tumor-transforming gene (PTTG)-1 is correlated with poor prognosis in glioma patients. *Oncol Rep* 15: 1569-74.

- Gilbertson, R.J., and Rich, J.N. (2007). Making a tumour's bed: glioblastoma stem cells and the vascular niche. *Nat. Rev. Cancer* 7, 733–736.
- Giménez-Abian JF, Sumara I, Hirota T, Hauf S, Gerlich D, De La Torre C, Ellenberg J, Peters, JM. (2004). Regulation of sister chromatid cohesion between chromosome arms. *Curr Biol* 14: 1187–1193.
- Gorr IH, Boos D, Stemmann O. (2005). Mutual inhibition of separase and Cdk1 by two-step complex formation. *Mol Cell* 19: 135–41.
- Grände M, Franzen A, Karlsson JO, Ericson LE, Heldin NE, Nilsson M. (2002). Transforming growth factor-beta and epidermal growth factor synergistically stimulate epithelial to mesenchymal transition (EMT) through a MEK-dependent mechanism in primary cultured pig thyrocytes. *J Cell Sci* 115: 4227–36.
- Grassian AR, Coloff JL, Brugge JS. (2011). Extracellular matrix regulation of metabolism and implications for tumorigenesis. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* ; 76: 313–324.
- Green KJ, Getsios S, Troyanovsky S, Godsel LM. (2010). Intercellular junction assembly, dynamics, and homeostasis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2: a000125.
- Grossmann J, Mohr S, Lapetina EG, Focchi C, Levine, AD. (1998). Sequential and rapid activation of select caspases during apoptosis of normal intestinal epithelial cells. *Am J Physiol* 274: G1117–G1124.
- Grossmann J. (2002). Molecular mechanisms of "detachment-induced apoptosis--Anoikis". *Apoptosis* 7: 247–60.
- Guillou H, Depraz-Depland A, Planus E, Vianay B, Chaussy J, Grichine A et al. (2008). Lamellipodia nucleation by filopodia depends on integrin occupancy and downstream Rac1 signaling. *Exp Cell Res* 314: 478–488.
- Hamid T, Kakar SS. (2004). PTTG/securin activates expression of p53 and modulates its function. *Mol Cancer* 3: 18.
- Hamid T, Malik MT, Kakar SS. (2005). Ectopic expression of PTTG1/securin promotes tumorigenesis in human embryonic kidney cells. *Mol Cancer* 4: 3.
- Hanahan D, Weinberg RA. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*. 100: 57–70.
- Hanahan D, Weinberg RA. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144: 646–74.
- Hansen RK, Bissell MJ. (2000). Tissue architecture and breast cancer: The role of extracellular matrix and steroid hormones. *Endocr Relat Cancer* 7: 95–113.
- Harris TJ, Tepass U. (2010). Adherens junctions: from molecules to morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11: 502–14.
- Heaney AP, Fernando M, Melmed S. (2002). Functional role of estrogen in pituitary tumor pathogenesis. *J Clin Invest* 109: 277–83.
- Heaney AP, Horwitz GA, Wang Z, Singson R, Melmed S. (1999). Early involvement of estrogen-induced pituitary tumor transforming gene and fibroblast growth factor expression in prolactinoma pathogenesis. *Nat Med* 5: 1317–21.
- Heaney AP, Nelson V, Fernando M, Horwitz G. (2001). Transforming events in thyroid tumorigenesis and their association with follicular lesions. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 5025–32.
- Heaney AP, Singson R, McCabe CJ, Nelson V, Nakashima M, Melmed S. (2000). Expression of pituitary-tumor transforming gene in colorectal tumours. *Lancet* 355: 716–719.
- Holland AJ, Böttger F, Stemmann O, Taylor SS. (2007). Protein phosphatase 2A and separase form a complex regulated by separase autocleavage. *J Biol Chem* 282: 24623–32.
- Holland AJ, Taylor SS. (2006). Cyclin-B1-mediated inhibition of excess separase is required for timely chromosome disjunction. *J Cell Sci* 119: 3325–36.
- Hollier BG, Evans K, Mani SA. (2009). The epithelial-to-mesenchymal transition and cancer stem cells: a coalition against cancer therapies. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 14:29–43.
- Hornig NC, Knowles PP, McDonald NQ, Uhlmann F. (2002). The dual mechanism of separase regulation by securin. *Curr Biol* 12: 973–82.
- Horwitz GA, Miklovsy I, Heaney AP, Ren SG, Melmed S. (2003). Human pituitary tumor-transforming gene (PTTG1) motif suppresses prolactin expression. *Mol Endocrinol* 17: 600–9.
- Huang,SQ, Q. J. Liao, X. W. Wang et al.. (2012) RNAi-mediated knockdown of pituitary tumor-transforming gene-1 (PTTG1) suppresses the proliferation and invasive potential of PC3 human prostate cancer cells. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* , vol. 45, no. 11, pp. 995–1001.
- Huang X, Hatcher R, York JP, Zhang P. (2005). Securin and separase phosphorylation act redundantly to maintain sister chromatid cohesion in mammalian cells. *Mol Biol Cell* 16: 4725–4732.
- Huber MA, Kraut N, Beug H. (2005). Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression. *Curr Opin Cell Biol* 17: 548–58.
- Hugo H, Ackland ML, Blick T, Lawrence MG, Clements JA, Williams ED, Thompson EW. (2007).

- Epithelial--mesenchymal and mesenchymal--epithelial transitions in carcinoma progression. *J Cell Physiol* 213: 374-83.
- Hui P, Xu X, Xu L, Hui G, Wu S, Lan Q.(2015). Expression of MMP14 in invasive pituitary adenomas: relationship to invasion and angiogenesis. *Int J Clin Exp Pathol*. Apr 1;8(4):3556-67.
- Hunter JA, Skelly RH, Aylwin SJ, Geddes JF, Evanson J, Besser GM, Monson JP, Burrin JM. . (2003). The relationship between pituitary tumour transforming gene (PTTG) expression and in vitro hormone and vascular endothelial growth factor (VEGF) secretion from human pituitary adenomas. *Eur J Endocrinol* 148: 203-211.
- Ilic D, Almeida EA, Schlaepfer DD, Dazin P, Aizawa S, Damsky CH. (1998). Extracellular matrix survival signals transduced by focal adhesion kinase suppress p53-mediated apoptosis. *J Cell Biol* 143: 547-560.
- Inman GJ. (2011). Switching TGF β from a tumor suppressor to a tumor promoter. *Curr Opin Gen Dev* 21:93-99.
- Ishikawa H, Heaney AP, Yu R, Horwitz GA & Melmed S.(2001) Human pituitary tumor-transforming gene induces angiogenesis. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 86 867-874.
- Ishikawa F, K Ushida, K Mori and M Shibamura.(2015). Loss of anchorage primarily induces non-apoptotic cell death in a human mammary epithelial cell line under atypical focal adhesion kinase signaling.. *Cell Death and Disease* 6, e1619
- Jallepalli PV, Waizenegger IC, Bunz F, Langer S, Speicher MR, Peters JM, Kinzler KW, Vogelstein B, Lengauer C. (2001). Securin is required for chromosomal stability in human cells. *Cell* 105: 445-57.
- Jeganathan KB, Baker DJ, van Deursen JM. (2006). Securin associates with APCCdh1 in prometaphase but its destruction is delayed by Rael and Nup98 until the metaphase/anaphase transition. *Cell Cycle* 5: 366-370.
- Kaessmann H. Origins, evolution, and phenotypic impact of new genes. (2010). *Genome research* 20: 1313-1326.
- Kakar SS, Jennes L. (1999). Molecular cloning and characterization of the tumor transforming gene (TUTR1): a novel gene in human tumorigenesis. *Cytogenet Cell Genet* 84: 211-216.
- Kakar SS. (1999). Molecular cloning, genomic organization, and identification of the promoter for the human pituitary tumor transforming gene (PTTG). *Gene* 240: 317-324.
- Kakar SS, Kakar C.(2015). Generation of transgenic mouse model using PTTG as an oncogene. *Methods Mol Biol*. 2015;1267:395-411.
- Kalluri R, Zeisberg M. (2006). Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer* 6: 392-401.
- Kao J, Salari K, Bocanegra M, Choi YL, Girard L, Gandhi J et al.(2009) Molecular profiling of breast cancer cell lines defines relevant tumor models and provides a resource for cancer genediscovery. *PLoS One* ; 4: e6146.
- Kanazawa S, Fujiwara T, Matsuzaki S, Shingaki K, Taniguchi M, et al. (2010) bFGF Regulates PI3-Kinase-Rac1-JNK Pathway and Promotes Fibroblast Migration in Wound Healing. *PLoS ONE* 5(8): e12228.
- Kim CS, Ying H, Willingham MC, Cheng SY. (2007a). The pituitary tumor-transforming gene promotes angiogenesis in a mouse model of follicular thyroid cancer. *Carcinogenesis* 28: 932-9.
- Kim D, Pemberton H, Stratford AL, Buelaert K, Watkinson JC, Lopes V, Franklyn JA, McCabe CJ. (2005). Pituitary tumour transforming gene (PTTG) induces genetic instability in thyroid cells. *Oncogene* 24: 4861-6.
- Kim DS, Franklyn JA, Boelaert K, Eggo MC, Watkinson JC, McCabe CJ. (2006a). Pituitary tumor transforming gene (PTTG) stimulates thyroid cell proliferation via a vascular endothelial growth factor/kinase insert domain receptor/inhibitor of DNA binding-3 autocrine pathway. *J Clin Endocrinol Metab* 91: 4603-11.
- Kim DS, Franklyn JA, Smith VE, Stratford AL, Pemberton HN, Warfield A, Watkinson JC, Ishmail T, Wakelam MJ, McCabe CJ. (2007b). Securin induces genetic instability in colorectal cancer by inhibiting double-stranded DNA repair activity. *Carcinogenesis* 28: 749-59.
- Kim DS, Franklyn JA, Stratford AL, Boelaert K, Watkinson JC, Eggo MC, McCabe CJ. (2006b). Pituitary tumor-transforming gene regulates multiple downstream angiogenic genes in thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 91: 1119-28.
- Kinzler KW, Vogelstein B. (1998). Landscaping the cancer terrain. *Science* 280: 1036-7.
- Korkaya H, Liu S, Wicha MS. (2011). Breast cancer stem cells, cytokine networks, and the tumor microenvironment. *J Clin Invest*.;121(10):3804-3809
- Kumada K, Yao R, Kawaguchi T, Karasawa M, Hoshikawa Y, Ichikawa K, Sugitani Y, Imoto I, Inazawa J, Sugawara M, Yanagida M, Noda T. (2006). The selective continued linkage of centromeres from mitosis to interphase in the absence of mammalian separase. *J Cell Biol* 172: 835-846.
- Lasorella A, Uo T, Iavarone A.(2001). Id proteins at the cross-road of development and cancer. *Oncogene*. Dec 20;20(58):8326-33

- Lönn P, van der Heide LP, Dahl M, Hellman U, Heldin CH, Moustakas A. (2010). PARP-1 attenuates Smadmediated transcription. *Mol. Cell* 40:521–32.
- López-Novoa JM, Nieto MA. (2009). Inflammation cancer progression. *EMBO Mol Med* 1:303–14.
- Laemmli UK. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-5.
- Lai Y, Xin D, Bai J, Mao Z, Na Y. (2007). The important anti-apoptotic role and its regulation mechanism of PTTG1 in UV-induced apoptosis. *J Biochem Mol Biol* 40: 966-72.
- Lee IA, Seong C, Choe IS. (1999). Cloning and expression of human cDNA encoding human homologue of pituitary tumor transforming gene. *Biochem Mol Biol Int* 47: 891-897.
- Lee JM, Dedhar S, Kalluri R, Thompson EW. (2006). The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease. *J Cell Biol* 172: 973-81.
- Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. (1998). Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 396: 643-9.
- Levy L, Hill CS. (2006). Alterations in components of the TGF-beta superfamily signaling pathways in human cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* 17: 41-58.
- Limón-Mortés MC, Mora-Santos M, Espina A, Pintor-Toro JA, López-Román A, Tortolero M,
- Lo HW, Hsu SC, Xia W, Cao X, Shih JY, Wei Y, Abbruzzese JL, Hortobagyi GN, Hung Mc. (2007). Epidermal growth factor receptor cooperates with signal transducer and activator of transcription 3 to induce epithelial-mesenchymal transition in cancer cells via up-regulation of TWIST gene expression. *Cancer Res* 67 9066-76.
- Lobo, N.A., Shimono, Y., Qian, D., and Clarke, M.F. (2007). The biology of cancer stem cells. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 23, 675–699.
- Malik MT, Kakar SS. (2006). Regulation of angiogenesis and invasion by human Pituitary tumor transforming gene (PTTG) through increased expression and secretion of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2). *Mol Cancer* 5: 61.
- Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, Brooks M, Reinhard F, Zhang CC, Shipitsin M, Campbell LL, Polyak K, Briskin C, Yang J, Weinberg RA. (2008) The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* 133: 704-15.
- Marshall JF, Nesbitt SA, Helfrich MH, Horton MA, Polakova K, Hart IR. (1991). Integrin expression in human melanoma cell lines: heterogeneity of vitronectin receptor composition and function. *Int J Cancer* 49: 924-931.
- Martin SS, Vuori K. (2004). Regulation of Bcl-2 proteins during anoikis and amorphosis. *Biochim Biophys Acta* 1692: 145-57.
- Massague J. (2008). TGFβ in cancer. *Cell* 134:215–30
- McCabe CJ, Boelaert K, Tannahill LA, Heaney AP, Stratford AL, Khaira JS, Hussain S, Sheppard MC, Franklyn JA, Gittos NJ. (2002). Vascular endothelial growth factor, its receptor KDR/Flk-1, and pituitary tumor transforming gene in pituitary tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 4238-44.
- McCabe CJ, Khaira JS, Boelaert K, Heaney AP, Tannahill LA, Hussain S, Mitchell R, Olliff J, Sheppard MC, Franklyn JA, Gittos NJ. (2003). Expression of pituitary tumour transforming gene (PTTG) and fibroblast growth factor-2 (FGF-2) in human pituitary adenomas: relationships to clinical tumour behaviour. *Clin Endocrinol (Oxf)* 58: 141-50.
- McGill G, Shimamura A, Bates RC, Savage RE, Fisher DE. (1997). Loss of matrix adhesion triggers rapid transformationselective apoptosis in fibroblasts. *J Cell Biol* 138: 901-911.
- Mei J, Huang X, Zhang P. (2001). Securin is not required for cellular viability, but is required for normal growth of mouse embryonic fibroblasts. *Curr Biol* 11: 1197-201.
- Minematsu T, Egashira N, Kajiya H, Takei M, Takekoshi S, Itoh Y, Tsukamoto H, Itoh J, Sanno N, Teramoto A, Osamura RY. (2007). PTTG is a secretory protein in human pituitary adenomas and in mouse pituitary tumor cell lines. *Endocr Pathol* 18: 8-15.
- Minematsu T, Suzuki M, Sanno N, Takekoshi S, Teramoto A, Osamura RY. (2006). PTTG overexpression is correlated with angiogenesis in human pituitary adenomas. *Endocr Pathol. Summer* 17: 143-53.
- Morel, A.-P., Lie`vre, M., Thomas, C., Hinkal, G., Ansieau, S., and Puisieux, A. (2008). Generation of breast cancer stem cells through epithelial-mesenchymal transition. *PLoS ONE* .
- Moreno-Mateos MA, Espina ÁG, Torres B, del Estal MM, Romero-Franco A, Ríos RM, Pintor-Toro JA. (2011). PTTG1/securin modulates microtubule nucleation and cell migration. *Mol Biol Cell* 22: 4302-11.
- Mu YM, Oba K, Yanase T, Ito T, Ashida K, Goto K, Morinaga H, Ikuyama S, Takayanagi R, Nawata H. (2003). Human pituitary tumor transforming gene (hPTTG) inhibits human lung cancer A549 cell growth through activation of p21(WAF1/CIP1). *Endocr J* 50: 771-81.
- Murakami M, Suzuki M, Nishino Y, Funaba M. (2010). Regulatory expression of genes related to

- metastasis by TGF-beta and activin A in B16 murine melanoma cells. *Mol Biol Rep* 37: 1279-86.
- Neve RM, Chin K, Fridlyand J, Yeh J, Baehner FL, Fevr T et al.(2006). A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. *Cancer Cell* ; 10:515-527.
- Nikiforov MA, Hagen K, Ossovskaya VS, Connor TM, Lowe SW, Deichman GI, Gudkov AV. (1996). p53 modulation of anchorage independent growth and experimental metastasis. *Oncogene* 13: 1709-19.
- Nikiforov MA, Kwek SS, Mehta R, et al. (1997). Suppression of apoptosis by bcl-2 does not prevent p53-mediated control of experimental metastasis and anchorage dependence. *Oncogene* 15: 3007-3012.
- Ogbagabriel S, Fernando M, Waldman F, Bose S, Heaney A. (2005) Securin is overexpressed in breast cancer. *Mod Pathol* 18:985-990.
- Owens TW, Valentijn AJ, Upton JP, Keeble J, Zhang L, Lindsay J, Zouq NK, Gilmore AP. (2009). Apoptosis commitment and activation of mitochondrial Bax during anoikis is regulated by p38MAPK. *Cell Death Differ* 16: 1551-62.
- Panguluri SK., Yeakel C., Kakar SS.(2008). PTTG: an important target gene for ovarian cancer therapy. *Journal of Ovarian Research*.1:6
- Paoli P, Giannoni E, Chiarugi P.(2013) Anoikis molecular pathways and its role in cancer progression.. *Biochim Biophys Acta* ; 1833: 3481-3498.
- Pasquale, E.B. (2010). Eph receptors and ephrins in cancer: bidirectional signalling and beyond. *Nat. Rev. Cancer* 10, 165-180.
- Pei L, Melmed S. (1997). Isolation and characterization of a pituitary tumor-transforming gene (PTTG). *Mol Endocrinol* 11: 433-441.
- Pei L (1998) Genomic organization and identification of an enhancer element containing binding sites for multiple proteins in rat pituitary tumor-transforming gene. *Journal of Biological Chemistry* 273 5219-5225.
- Pei L 1999 Pituitary tumor-transforming gene protein associates with ribosomal protein S10 and a novel human homologue of DnaJ in testicular cells. *Journal of Biological Chemistry* 274 3151-3158..
- Pei L. (2000). Activation of mitogen-activated protein kinase cascade regulates pituitary tumor-transforming gene transactivation function. *J Biol Chem* 275: 31191-31198.
- Pei L. (2001). Identification of c-myc as a downstream target for pituitary tumor-transforming gene. *J Biol Chem* 276: 8484-91.
- Pfleghaar K, Heubes S, Cox J, Stemmann O, Speicher MR. (2005). Securin is not required for chromosomal stability in human cells. *PLoS Biol* 3: e416.
- Polette M, Nawrocki-Raby B, Gilles C, Clavel C, Birembaut P. (2004). Tumour invasion and matrix metalloproteinases. *Crit Rev Oncol Hematol* 49: 179-86.
- Prezant TR, Kadioglu P, Melmed S. (1999). An intronless homolog of human proto-oncogene hPTTG is expressed in pituitary tumors: evidence for hPTTG family. *J Clin Endocrinol Metab* 84: 1149-1152.
- Ptashne M. (1988). How eukaryotic transcriptional activators work. *Nature* 335: 683-9.
- Puri R, Tousson A, Chen L, Kakar SS. (2001). Molecular cloning of pituitary tumor transforming gene 1 from ovarian tumors and its expression in tumors. *Cancer Lett.* 163: 131-139.
- Ramaswamy S, Ross KN, Lander ES, Golub TR. (2003). A molecular signature of metastasis in primary solid tumors. *Nat Genet* 33: 49-54.
- Ramos-Morales F, Dominguez A, Romero F, Luna R, Multon MC, Pintor-Toro JA, Tortolero M. (2000). Cell cycle regulated expression and phosphorylation of hpttg proto-oncogene product. *Oncogene* 19: 403-409.
- Raza, A., Franklin, M.J., and Dudek, A.Z. (2010). Pericytes and vessel maturation during tumor angiogenesis and metastasis. *Am. J. Hematol.* 85, 593-598.
- Reginato MJ, Mills KR, Paulus JK, Lynch DK, Sgroi DC, Debnath J, Muthuswamy SK, Brugge JS. (2003). Integrins and EGFR coordinately regulate the pro-apoptotic protein Bim to prevent anoikis. *Nat Cell Biol* 5: 733-40.
- P.J. Reddig, R.L. Juliano, Clinging to life: cell to matrix adhesion and cell survival, *Cancer Metastasis Rev.* 24 (2005) 425-439.
- Rehfeld N, Geddert H, Atamna A, Rohrbeck A, Garcia G, Kliszewski S, Neukirchen J, Bruns I, Steidl U, Fenk R, Gabbert HE, Kronenwett R, Haas R, Rohr UP. (2006). The influence of the pituitary tumor transforming gene-1 (PTTG-1) on survival of patients with small cell lung cancer and non-small cell lung cancer. *J Carcinog* 20; 5:4.
- Reyal T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 414: 105-11.
- Rico-Varela J, Singh T, McCutcheon S, Vazquez M (2015) EGF as a New Therapeutic Target for Medulloblastoma Metastasis. *Cell Mol Bioeng.* 2015 Dec;8(4):553-565.
- Romashkova JA, Makarov SS. (1999). NF-kappaB is a target of AKT in anti-apoptotic PDGF signalling. *Nature* 401: 86-90.

- Romero F, Gil-Bernabé AM, Sáez C, Japón MA, Pintor-Toro JA, Tortolero M. (2004). Securin is a target of the UV response pathway in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 24: 2720-33.
- Romero F, Multon MC, Ramos-Morales F, Domínguez A, Bernal JA, Pintor-Toro JA, Tortolero M. (2001). Human securin, hPTTG, is associated with Ku heterodimer, the regulatory subunit of the DNA-dependent protein kinase. *Nucleic Acids Res* 29: 1300-7.
- Romero F. (2008). UV-induced degradation of securin is mediated by SKP1-CUL1-beta TrCP E3 ubiquitin ligase. *J Cell Sci* 121: 1825-31.
- Rosen K, Coll ML, Li A, Filmus J. (2001). Transforming growth factor-alpha prevents detachment-induced inhibition of c-Src kinase activity, Bcl-XL down-regulation, and apoptosis of intestinal epithelial cells. *J Biol Chem* 276: 37273-9.
- Rubinek T, Chesnokova V, Wolf I, Wawrowsky K, Vlotides G, Melmed S. (2007). Discordant proliferation and differentiation in pituitary tumor-transforming gene-null bone marrow stem cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 293: C1082-92.
- Ruchaud S, Carmenta M, Earnshaw WC. (2007). Chromosomal passengers: conducting cell division. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 798-812.
- Rytömaa M, Martins LM, Downward J. (1999). Involvement of FADD and caspase-8 signalling in detachment-induced apoptosis. *Curr Biol* 9: 1043-6.
- Saez C, Japón MA, Ramos-Morales F, Romero F, Segura DI, Tortolero M, Pintor-Toro JA. (1999). hpttg is over-expressed in pituitary adenomas and other primary epithelial neoplasias. *Oncogene* 18: 5473-5476.
- Sáez C, Martínez-Brocca MA, Castilla C, Soto A, Navarro E, Tortolero M, Pintor-Toro JA, Japón MA. (2006). Prognostic significance of human pituitary tumor-transforming gene immunohistochemical expression in differentiated thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 91: 1404-9.
- Sáez C, Pereda T, Borrero JJ, Espina A, Romero F, Tortolero M, Pintor-Toro JA, Segura DI, Japón MA. (2002). Expression of hpttg proto-oncogene in lymphoid neoplasias. *Oncogene* 21: 8173-7.
- Salehi F, Kovacs K, Scheithauer BW, Lloyd RV, Cusimano M. (2008). Pituitary tumor-transforming gene in endocrine and other neoplasms: a review and update. *Endocr Relat Cancer*. 2008 Sep;15(3):721-43.
- Schaller MD. (1996). The focal adhesion kinase. *J Endocrinol* 150: 1-7.
- Scholey JM, Brust-Mascher I, Mogilner A. (2003). Cell division. *Nature* 422: 746-52.
- Shah PP, Fong MY, Kakar SS. (2011). PTTG induces EMT through integrin $\alpha(V)\beta(3)$ -focal adhesion kinase signaling in lung cancer cells. *Oncogene* doi: 10.1038/onc.2011.488.
- Shah PP, Kakar SS. (2011). Pituitary tumor transforming gene induces epithelial to mesenchymal transition by regulation of Twist, Snail, Slug, and E-cadherin. *Cancer Lett* 311: 66-76.
- Shah PP., Fong MY., Kakar SS. (2012). PTTG induces EMT through integrin AlphaV Beta3-focal adhesion kinase signaling in lung cancer cells. *Oncogene*. Jun 28; 31(26): 3124–3135.
- Shibata Y, Haruki N, Kuwabara Y, Nishiwaki T, Kato J, Shinoda N, Sato A, Kimura M, Koyama H, Toyama T, Ishiguro H, Kudo J, Terashita Y, Konishi S, Fujii Y. (2002). Expression of PTTG (pituitary tumor transforming gene) in esophageal cancer. *Jpn J Clin Oncol* 32: 233-237.
- Siegel PM, Shu W, Cardiff RD, Muller WJ, Massagué J. (2003). Transforming growth factor beta signaling impairs Neu-induced mammary tumorigenesis while promoting pulmonary metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 8430-5.
- Singh, A., and Settleman, J. (2010). EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer. *Oncogene* 29, 4741–4751.
- Solbach C, Roller M, Fellbaum C, Nicoletti M, Kaufmann M. (2004). PTTG mRNA expression in primary breast cancer: a prognostic marker for lymph node invasion and tumor recurrence. *Breast* 13: 80-1.
- Solbach C., Roller M., Eckerdt F., Peter S. and Knecht R. (2006). Pituitary tumor-transforming gene expression is a prognostic marker for tumor recurrence in squamous cell carcinoma of the head and neck. *BMC Cancer* 2006, 6:242
- Stoika R & Melmed S (2002) Expression and function of pituitary tumour transforming gene for T-lymphocyte activation. *British Journal of Haematology* 119 1070–1074.
- Stratford AL, Boelaert K, Tannahill LA, Kim DS, Warfield A, Eggo MC, Gittoes NJ, Young LS, Franklyn JA, McCabe CJ. (2005). Pituitary tumor transforming gene binding factor: a novel transforming gene in thyroid tumorigenesis. *J Clin Endocrinol Metab* 90: 4341–4349.
- Sun X, Cheng G, Hao M, Zheng J, Zhou X, Zhang J, Taichman RS, Pienta KJ, and Wang J. (2010). CXCL12/CXCR4/CXCR7 Chemokine Axis and Cancer Progression. *Cancer Metastasis Rev*. December ; 29(4): 709–722.
- Taddei ML., E. Giannoni, T. Fiaschi, P. Chiarugi, (2012). Anoikis: an emerging hallmark in health and diseases, *J. Pathol.* 226 380–393.

- Tarasewicz E. and Jeruss JS. (2012). Phospho-specific Smad3 signaling. *Cell Cycle* 11:13, 2443-2451
- Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ. (2008). Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9: 231-41.
- Tfelt-Hansen J, Kanuparthi D, Chattopadhyay N. (2006). The emerging role of pituitary tumor transforming gene in tumorigenesis. *Clin Med Res* 4: 130-7.
- Tfelt-Hansen J, Schwarz P, Terwilliger EF, Brown EM, Chattopadhyay N. (2003). Calcium-sensing receptor induces messenger ribonucleic acid of human securin, pituitary tumor transforming gene, in rat testicular cancer. *Endocrinology* 144: 5188-93.
- Tfelt-Hansen J, Yano S, Bandyopadhyay S, Carroll R, Brown EM, Chattopadhyay N. (2004). Expression of pituitary tumor transforming gene (PTTG) and its binding protein in human astrocytes and astrocytoma cells: function and regulation of PTTG in U87 astrocytoma cells. *Endocrinology* 145: 4222-31.
- Thomas FT, Contreras JL, Bilbao G, Ricordi C, Curiel D, Thomas JM. (1999). Anoikis, extracellular matrix, and apoptosis factors in isolated cell transplantation. *Surgery* 126: 299–304.
- Thompson AD 3rd, Kakar SS. (2005). Insulin and IGF-1 regulate the expression of the pituitary tumor transforming gene (PTTG) in breast tumor cells. *FEBS Lett* 579: 3195-200.
- Tong Y, Ben-Shlomo A, Zhou C, Wawrowsky K, Melmed S. (2008). Pituitary tumor transforming gene 1 regulates Aurora kinase A activity. *Oncogene* 27: 6385–6395.
- Tong Y, Eigler T. (2009). Transcriptional targets for pituitary tumor-transforming gene-1. *J Mol Endocrinol* 43: 179-85.
- Tong Y, Tan Y, Zhou C, Melmed S. (2007). Pituitary tumor transforming gene interacts with Sp1 to modulate G1/S cell phase transition. *Oncogene* 26: 5596-605.
- Trepat X, Chen Z, Jacobson K. (2012). Cell migration. *Compr Physiol*. 2012 Oct;2(4):2369-92.
- Triebenberger SJ. (1995). Structure and function of transcriptional activation domains. *Curr Opin Genet Dev* 5: 190-6.
- Tsai SJ, Lin SJ, Cheng YM, Chen HM, Wing LY. (2005). Expression and functional analysis of pituitary tumor transforming gene-1 [corrected] in uterine leiomyomas. *J Clin Endocrinol Metab* 90: 3715-23.
- Tsuyada A, Chow A., Wu J, Somlo G, Chu P, Loera S, Luu T, Xuejun Li A, Wu X, Ye W, Chen S, Zhou W, Yu Y, Wang YZ, Ren X, Li H, Scherle P, Kuroki Y, and Wang SE. (2012) CCL2 mediates crosstalk between cancer cells and stromal fibroblasts that regulates breast cancer stem cells. *Cancer Res.* June 1; 72(11): 2768–2779.
- Uhlmann F. (2001). Secured cutting: controlling separase at the metaphase to anaphase transition. *EMBO Rep* 2: 487-92.
- Uhlmann F. (2003). Chromosome cohesion and separation: from men and molecules. *Curr Biol* 13: R104-14.
- Varadhachary AS, Edidin M, Hanlon AM, Peter ME, Krammer PH, Salgame P. (2001). Phosphatidylinositol 3'-kinase blocks CD95 aggregation and caspase-8 cleavage at the death-inducing signaling complex by modulating lateral diffusion of CD95. *J Immunol* 166: 6564-9.
- Vestweber D, Blanks JE. (1999). Mechanisms that regulate the function of the selectins and their ligands. *Physiol Rev* 79: 181-213.
- Vlotides G, Cruz-Soto M, Rubinek T, Eigler T, Auernhammer CJ, Melmed S. (2006). Mechanisms for growth factor-induced pituitary tumor transforming gene-1 (PTTG1) expression in pituitary folliculostellate TtT/GF cells. *Mol Endocrinol* 20: 3321–3335.
- Vlotides G, Eigler T, Melmed S. (2007). Pituitary tumor-transforming gene: physiology and implications for tumorigenesis. *Endocr Re* 28: 165-86.
- Vlotides G, Siegel E, Donangelo I, Gutman S, Ren SG, Melmed S. (2008). Rat prolactinoma cell growth regulation by epidermal growth factor receptor ligands. *Cancer Res.* Aug 1;68(15):6377-86.
- Waizenegger I, Giménez-Abián JF, Wernic D, Peters JM. (2002). Regulation of human separase by securin binding and autocleavage. *Curr Biol* 12: 1368-78.
- Waizenegger IC, Hauf S, Meinke A, Peters JM. (2000). Two distinct pathways remove mammalian cohesin from chromosome arms in prophase and from centromeres in anaphase. *Cell* 103: 399-410.
- Wang F, Dai J, Daum JR, Niedzialkowska E, Banerjee B, Stukenberg PT, Gorbsky GJ, Higgins JM. (2010a). Histone H3 Thr-3 phosphorylation by Haspin positions Aurora B at centromeres in mitosis. *Science* 330: 231-5.
- Wang SP, Wang WL, Chang YL, Wu CT, Chao YC, Kao SH, Yuan A, Lin CW, Yang SC, Chan WK, Li KC, Hong TM, Yang PC. (2009). p53 controls cancer cell invasion by inducing the MDM2-mediated degradation of Slug. *Nat Cell Biol* 11: 694-704.
- Wang Z, Melmed S. (2000). Pituitary tumor transforming gene (PTTG) transforming and transactivation activity. *J Biol Chem* 275: 7459-61.
- Wang Z, Moro E, Kovacs K, Yu R, Melmed S. (2003). Pituitary tumor transforming gene-null male

- mice exhibit impaired pancreatic beta cell proliferation and diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 3428-32.
- Wang Z, Yu R, Melmed S. (2001). Mice lacking pituitary tumor transforming gene show testicular and splenic hypoplasia, thymic hyperplasia, thrombocytopenia, aberrant cell cycle progression, and premature centromere division. *Mol Endocrinol* 15: 1870-9.
- Wardlaw CP. (2010). Protein phosphatase 2A contributes to separase regulation and the co-ordination of anaphase. *Bioscience Horizons* 3: 66-76.
- Waterman-Storer CM, Salmon WC, Salmon ED. (2000). Feedback interactions between cell-cell adherens junctions and cytoskeletal dynamics in newt lung epithelial cells. *Mol Biol Cell* 11: 2471-83.
- Weis SM, Cheresh DA. (2011). α v Integrins in Angiogenesis and Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Med* 1: a006478.
- Wen CY, Nakayama T, Wang AP, Nakashima M, Ding YT, Ito M, Ishibashi H, Matsuo M, Shichijo K & Sekine I (2004). Expression of pituitary tumor transforming gene in human gastric carcinoma. *World Journal of Gastroenterology* 10 481-483.
- Westhoff MA , Oliver Brühl and Klaus-Michael Debatin (2014) *Molecular and Cellular Pediatrics* , 1:10
- Westhoff MA, Bruhl O, Nonnenmacher L, Karpel-Massler G, Debatin KM.(2014) Killing me softly-future challenges in apoptosis research. *Int J Mol Sci* 15:3746-3767.
- Winnepenninckx V, Debiec-Rychter M, Belien JA, Fiten P, Michiels S, Lazar V, Opdenakker G, Meijer GA, Spatz A & van den Oord JJ. (2006) Expression and possible role of hPTTG1/securin in cutaneous malignant melanoma. *Modern Pathology* 19 1170-1180.
- Xia H, Nho RS, Kahm J, Kleidon J, Henke CA. (2004). Focal adhesion kinase is upstream of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt in regulating fibroblast survival in response to contraction of type I collagen matrices via a beta 1 integrin viability signaling pathway. *J Biol Chem* 279: 33024-34.
- Yan H, Wang W, Dou CH, Tian F and Qi S. (2015). Securin promotes migration and invasion via matrix metalloproteinases in glioma cells. *ONCOLOGY LETTERS* 9: 2895-2901.
- Yan S, Zhou C, Lou X, Xiao Z, Zhu H, Wang Q, Wang Y, Lu N, He S, Zhan Q, Liu S, Xu N. (2009). PTTG overexpression promotes lymph node metastasis in human esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* Apr 15;69(8):3283-90.
- Yin H, Fujimoto N, Maruyama S, Asano K. (2001). Strain difference in regulation of pituitary tumor transforming gene (PTTG) in estrogen-induced pituitary tumorigenesis in rats. *Jpn J Cancer Res* 92: 1034-40.
- Yoon CH, Kim MJ, Lee H, Kim RK, Lim EJ, Yoo KC, Lee GH, Cui YH, Oh YS, Gye MC, Lee YY, Park IC, An S, Hwang SG, Park MJ, Suh Y, Lee SJ. (2012). PTTG1 oncogene promotes tumor malignancy via epithelial to mesenchymal transition and expansion of cancer stem cell population. *J Biol Chem.* 2012 Jun 1;287(23):19516-27.
- Youle RJ, Strasser A. (2008). The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9: 47-59.
- Yu R, Cruz-Soto M, Li Calzi S, Hui H, Melmed S. (2006). Murine pituitary tumor-transforming gene functions as a securin protein in insulin-secreting cells. *J Endocrinol* 191: 45-53.
- Yu R, Heaney AP, Lu W, Chen J, Melmed S. (2000a). Pituitary tumor transforming gene causes aneuploidy and p53-dependent and p53-independent apoptosis. *J Biol Chem* 275: 36502-36505.
- Yu R, Lu W, Chen J, McCabe CJ, Melmed S. (2003). Overexpressed pituitary tumor-transforming gene causes aneuploidy in live human cells. *Endocrinology* 144: 4991-8.
- Yu R, Melmed S. (2001).Oncogene activation in pituitary tumors. *Brain Pathol* 11: 328-341.
- Yu R, Ren SG, Horwitz GA, Wang Z, Melmed S. (2000b). Pituitary tumor transforming gene (PTTG) regulates placental JEG-3 cell division and survival: evidence from live cell imaging. *Mol Endocrinol* 14: 1137-1146.
- Yu SH, Yang PM, Peng CW, Yu YC, Chiu SJ. (2011). Securin depletion sensitizes human colon cancer cells to fisetin-induced apoptosis. *Cancer Lett* 300: 96-104.
- Zhang E, Liu S, Xu Z, Huang S, Tan X, Sun C, Lu L. (2014). Pituitary tumor-transforming gene 1 (PTTG1) is overexpressed in oral squamous cell carcinoma (OSCC) and promotes migration, invasion and epithelial-mesenchymal transition (EMT) in SCC15 cells. *Tumour Biol.* 2014 Sep;35(9):8801-11.
- Zhang J, Patel L, and Piental KJ. (2010). CC chemokine ligand 2 (CCL2) promotes prostate cancer tumorigenesis and metastasis. *Cytokine Growth Factor Rev.* February ; 21(1): 41-48.
- Zhang X, Horwitz GA, Heaney AP, Nakashima M, Prezant TR, Bronstein MD, Melmed S. (1999a). Pituitary tumor transforming gene (PTTG) expression in pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 84: 761-767.
- Zhang X, Horwitz GA, Prezant TR, Valentini A, Nakashima M, Bronstein MD, Melmed S. (1999b).

Structure, expression, and function of human pituitary tumor-transforming gene (PTTG). *Mol Endocrinol* 13: 156-166.

Zheng Y, Guo J, Zhou J, Lu J, Chen Q, Zhang C, Qing Ch, Koeffler HP and Tong Y. (2015) FoxM1 transactivates PTTG1 and promotes colorectal cancer cell migration and invasion.. *BMC Medical Genomics* 8:49

Zhou C, Tong Y, Wawrowsky K and Shlomo Melmed (2014) PTTG Acts As a STAT3 Target Gene for Colorectal Cancer Cell Growth and Motility. *Oncogene*. February 13; 33(7): 851–861.

Zhou C, Liu S, Zhou X, Xue L, Quan L, Lu N, Zhang G, Bai J, Wang Y, Liu Z et al. 2005 Overexpression of human pituitary tumor transforming gene (hPTTG), is regulated by beta-catenin/TCF pathway in human esophageal squamous cell carcinoma. *International Journal of Cancer* 113 891–898

Zou H, McGarry TJ, Bernal T, Kirschner MW. (1999). Identification of a vertebrate sister-chromatid separation inhibitor involved in transformation and tumorigenesis. *Science* 285: 418-422.

Zur A, Brandeis M. (2001). Securin degradation is mediated by fzy and fzr, and is required for complete chromatid separation but not for cytokinesis. *EMBO J* 20: 792–801.

